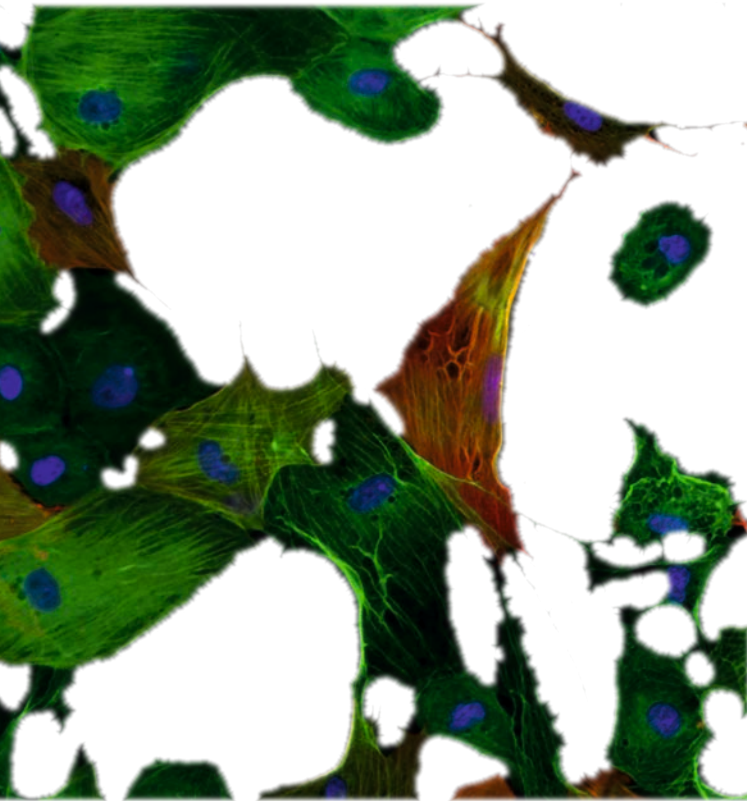


Die enterische Muskulatur als Quelle des neurotrophen Faktors GDNF

TIM HOHMEIER



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus „Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-
Liebig-Universität Gießen“

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

und

„Anatomisches Institut der Christian-Albrechts Universität zu Kiel“

Betreuerin: PD. Dr. Martina Böttner

Die enterische Muskulatur als Quelle des neurotrophen Faktors GDNF

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Tim Hohmeier

Tierarzt aus Gedern

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Bergmann
Frau PD Dr. Martina Böttner
Herr Prof. Dr. H. Willems

Tag der Disputation: 09. November 2015

Diese Arbeit widme ich meinem Opa Erwin Schneider (07.02.1930; † 18.02.2010).*

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Worms, den 04.04.2015

Tim Hohmeier

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Die enterische Muskulatur	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Histogenese	1
1.1.3 Anatomie der glatten Muskulatur.....	2
1.1.4 Innervation	4
1.1.5 Glattemuskulärer Apparat	5
1.1.6 Caldesmon	6
1.2 Das enterische Nervensystem.....	6
1.2.1 Definition	6
1.2.2 Anatomie	7
1.3 Motilität und Motilitätsstörungen	8
1.4 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)	9
1.5 Divertikelkrankheit	11
2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Materialien.....	13
3.1.1 Chemikalien	13
3.1.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	15
3.1.3 Kits	17
3.1.4 Antikörper.....	17
3.1.5 Puffer und Lösungen	18
3.1.6 Nukleotide und Wachstumsfaktoren.....	20
3.1.7 Enzyme	20
3.1.8 Gewebe.....	21
3.1.8.1 Rattendarm	21
3.1.8.2 Zellkultur.....	21

3.2 Methoden	22
3.2.1 Zellkultur	22
3.2.1.1 Zellkultur enterischer Neurone	22
3.2.1.2 Zellkultur enterischer Muskelzellen	23
3.2.1.3 Kokultur enterischer Nerven- und Muskelzellen	24
3.2.2 mRNA-Expressionsstudien	24
3.2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen enterischer Muskeln.....	24
3.2.2.2 RNA-Isolierung aus Vollwandgewebe	24
3.2.2.3 Reverse Transkription (RT)	25
3.2.2.4 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan Sonde	27
3.2.3 Paraffinschnitte	30
3.2.4 Histologische Verfahren	31
3.2.4.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) nach Mayer	31
3.2.4.2 Azan-Färbung	32
3.2.5 Immunhistochemische Verfahren.....	33
3.2.5.1 Prinzip der Immunhistochemie	33
3.2.5.2 Immunhistochemie mit DAB als Chromogen am Vollwandgewebe	34
3.2.5.3 Immunzytochemie mit DAB als Chromogen an kultivierten enterischen Zellen	37
3.2.5.4 Fluoreszenz-Immunzytochemie an kultivierten enterischen Muskelzellen.....	39
3.2.6 Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse.....	42
4.1 Entwicklung der enterischen Muskulatur im Rattendarm.....	42
4.2 Ontogenetische mRNA Expression des GDNF Systems im Rattendarm	49
4.3 Lokalisation von Caldesmon in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen .	51
4.4 mRNA Expression des GDNF-Systems in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen	52
4.5 Charakterisierung enterischer Neurone in Kokulturen.....	54
5 Diskussion	56

5.1 Grundlegende Ergebnisse.....	56
5.2 Ontogenese der Muskulatur im Rattendarm.....	57
5.3 mRNA Expression des GDNF-Systems	58
5.4 Lokalisation von Caldesmon in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen .	60
5.5 mRNA-Expression des GDNF Systems in kultivierten glatten Muskelzellen und Charakterisierung enterischer Neurone in Kokulturen.....	61
5.6 Bedeutung der Ergebnisse bezüglich der Pathogenese der Divertikelkrankheit.....	64
5.7 Aussicht.....	66
6 Zusammenfassung.....	67
7 Summary	70
8 Literaturverzeichnis	72
8 Danksagung.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Keimblattbildung nach Dias und McLone (McLone, 2001).	2
Abb. 2: Ultrastruktur von synthetischen und kontraktile glatten Muskelzellen nach Rensen et al (Rensen et al., 2007).	4
Abb. 3: Das enterische Nervensystem nach Furness (Furness, 2012).....	8
Abb. 4: Enterische Muskulatur im Dünndarm der Ratte, Entwicklungsstadium P2. ...	43
Abb. 5: Enterische Muskulatur im Kolon der Ratte, Entwicklungsstadium P2.....	44
Abb. 6: Enterische Muskulatur im Dünndarm der Ratte, Entwicklungsstadium P21.	45
Abb. 7: Enterische Muskulatur im Kolon der Ratte, Entwicklungsstadium P21.....	46
Abb. 8: Enterische Muskulatur im Dünndarm der adulten Ratte.	47
Abb. 9: Enterische Muskulatur im Kolon der adulten Ratte.....	48
Abb. 10: Ontogenetische mRNA Expression des GDNF-Systems im Rattendarm... ..	50
Abb. 11: Lokalisation von Caldesmon in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen.	51
Abb. 12: mRNA Expression des GDNF-Systems in kultivierten enterischen glatten Muskelzellen.	53
Abb. 13: Netzbildung enterischer Neurone in Kokulturen.....	55
Abb. 14: Modell „Neurotropher-Faktor-Konzept“ im Intestinaltrakt.....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	13
Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte	15
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 4: Verwendete Kits	17
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	17
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen	18
Tabelle 7: Verwendete Nukleotide und Wachstumsfaktoren	20
Tabelle 8: Verwendete Enzyme	20
Tabelle 9: Arbeitsprotokoll für den DNase Verdau und die cDNA Synthese mittels reverser Transkription	26
Tabelle 10: Protokoll der qPCR	28
Tabelle 11: Verwendete Primer der qPCR	29
Tabelle 12: Protokoll Paraffineinbettung	30
Tabelle 14: Protokoll Azan-Färbung	32
Tabelle 15: Arbeitsprotokoll der Immunhistochemie nach der ABC Methode und mit DAB als Chromogen an paraffineingebettetem Vollwandgewebe des Rattendarms	35
Tabelle 16: Antikörper, die in der Immunhistochemie von Rattenvollwandgewebe verwendet wurden	37
Tabelle 17: Arbeitsprotokoll der Immunhistochemie nach der LSAB-Methode und mit DAB als Chromogen an kultivierten enterischen Rattenmuskelzellen ...	38
Tabelle 18: Antikörper, die in der Immunhistochemie der Zellkulturen verwendet wurden	39
Tabelle 19: Arbeitsprotokoll der Fluoreszenz-Immunzytochemie an kultivierten enterischen Rattenmuskelzellen	40
Tabelle 20: Antikörper, die in der Fluoreszenz-Immunzytochemie der enterischen Muskelzellen verwendet wurden	41

Abkürzungsverzeichnis

6FAM	6-(Carboxy-Fluorescein)	FRET	fluorescence resonance energy transfer
AG	Antigen		
AK	Antikörper	GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
ARTN	Artemin	GFL	GDNF-family ligands
ATP	Adenosintriphosphat	GFR α 1	GDNF-family Rezeptor α 1
BMP	bone morphogenetic protein	GIP	glucoseabhängiges insulinotrophes Peptid
Bp	Basenpaar		
CaD	Caldesmon	GIT	Gastrointestinaltrakt
CALD1	Caldesmon	HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	h-CaD	high molecular weight caldesmon
CDU	Collagen digesting units	HE	Hämatoxilin-Eosin
CM	Ringmuskulatur	HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Ct	Cycle threshold	ICC	Interstitielle Cajal Zelle
DAB	3-3´-Diaminobenzidin	IHC	Immunhistochemie
DAPI	4´,6-Diamidin-2-phenylindol	ISMC	intestinal smooth muscle cell
DIV	Divertikelkrankheit	I-CaD	low molecular weight caldesmon
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LM	Längsmuskulatur
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate	LMM	lamina muscularis mucosae
DTT	Dithiothreitol	LSAB	labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode
E 1-18	Embryonaltag 1-18	MEM	minimum essential medium
EDTA	Ethylenediamine-tetraaceticacid	Mf	Myofilament
ENS	Enterisches Nervensystem	MLCK	myosin light chain kinase
Fc	Kristallines Fragment		
FCS	fetales Kälberserum		

MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus	RET	rearranged during transfection
RT	reverse Transkriptase	RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonucleinsäure	RT	reverse Transkription
Muc	Mukosa	RT-qPCR	Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
MW	Mittelwert	SEM	Standardfehler
Nc	Zellkern	SMC	smooth muscle cell
NCC	Neural crest cell	Sub	Submukosa
NRTN	Neurturin	TAMRA	Tetramethylrhodamin
NT-3	Neurotrophin-3	TBS	Tris buffered saline
P	Signifikanzwert	TGF	Transforming Growth Factor
P 0-21	Postnataltag 0-21	TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
PBS	phosphate buffered saline	VSMC	vascular smooth muscle cell
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	ZNS	Zentrales Nervensystem
PDL	Poly-D-Lysin	α -SMA	alpha-smooth muscle actin
PM	plexus myentericus		
PSPN	Persephin		

1 Einleitung

1.1 Die enterische Muskulatur

1.1.1 Definition

Unter enterischer Muskulatur versteht man die Gesamtheit der glattmuskulären Anteile des Darmtraktes. Der wesentliche Teil wird von der Tunica muscularis gebildet, die sich in eine Ring- (Stratum circulare) und Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale) unterteilt. Des Weiteren verläuft in der Tunica mucosa die Lamina muscularis mucosae, aus welcher zusätzlich einzelne glatte Muskelzellen in die Darmzotten ausstrahlen und dort als „Zottenpumpe“ bezeichnet werden (Lüllmann-Rauch, 2012).

1.1.2 Histogenese

Während der Embryogenese kommt es am Ende der Furchung zur Ausbildung des Trophoblasten (äußere Zellschicht) und der Embryozyste bzw. des Embryoblasten (innere Zellmasse) durch die Blastomeren (Furchungszellen). Als Delamination wird das Auftreten einer weiteren Zellschicht, des Hypoblasten, bezeichnet. Dieser liegt innerhalb des Trophoblasten und stellt das Entoderm dar (Sinowatz et al., 1998). Während in der ersten Phase der Keimblattbildung Ento- und Ektoderm entstehen, kommt es in der zweiten Phase der Keimblattbildung im Bereich der Primitivrinne durch eine ektodermale Einstülpung zur Ausbildung von Proliferationszentren für das Mesoderm (Abb. 1). Dieses stellt die spätere Grundlage für die glatte Muskulatur im Darm dar.

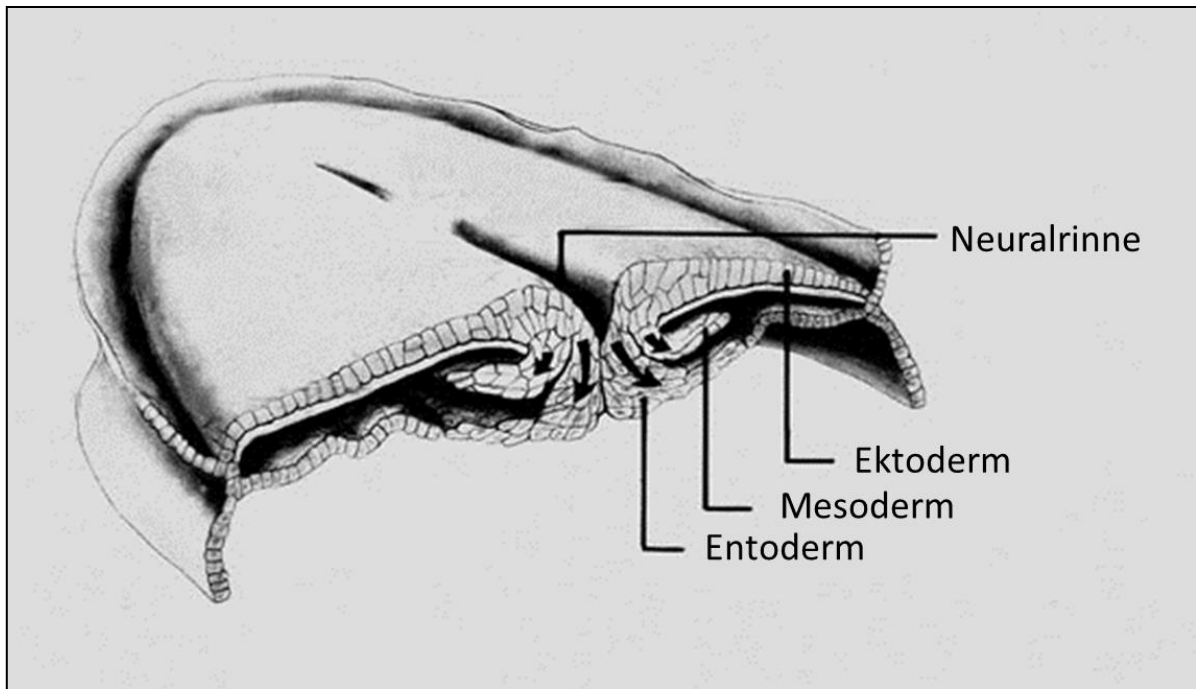


Abb. 1: Keimblattbildung nach Dias und McLone (McLone, 2001).

Nach Entstehung des Ekto- und Entoderms bildet sich in der zweiten Phase der Keimblattbildung durch ektodermale Einstülpungen das Mesoderm.

Im Zuge der weiteren Differenzierung des Mesoderms kommt es zur Entwicklung des paraxialen und des lateralen Mesoderms. Das laterale Mesoderm besteht seinerseits aus einem parietalen und viszeralem Blatt, welches sich mit dem Entoderm verbindet. Diese zwei Anteile, viszerales Blatt des lateralen Mesoderms und Entoderm, bilden schließlich das Darmrohr. Mit Ausnahme des Epithels und der Drüsen, die aus dem Entoderm entstehen, werden alle Schichten des Darms vom Mesoderm gebildet. Somit sind die glatten Muskelzellen mesodermalen Ursprungs (Roberts, 2000).

1.1.3 Anatomie der glatten Muskulatur

Die glatte Muskelzelle hat spindelförmige Gestalt und variiert je nach Herkunftsort und Funktion in ihrer Länge zwischen 20 µm und 800 µm und in ihrem Durchmesser zwischen 5 µm und 8 µm. Im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur sind in der glatten Muskulatur die Aktin- und Myosinfilamente weniger geordnet. Daher weist die glatte Muskulatur keine Querstreifung auf. Kennzeichnend sind die als Verdichtungszone im Zytoplasma oder an der Plasmamembran bezeichneten Areale sowie Caveolae (Einstülpungen der Zellmembran) an der Plasmamembran.

Gap junctions dienen der funktionellen Kopplung. Die glatte Muskelzelle besitzt zwei Filamentsysteme: das Netz des Zytoskelettes und den kontraktilen Apparat. Das Netz des Zytoskelettes besteht aus Intermediärfilamenten (Desmin) und nicht-muskulärem Aktin, welches in den Verdichtungszone im Zytoplasma (cytoplasmic dense bodies) und der Plasmamembran (attachment plaques) verankert ist. Der kontraktile Apparat, als zweites Filamentsystem, besteht aus den Myofilamenten α -Aktin- und verschiedenen Myosin-Isotypen. Auch hier sind die Aktinfilamente in den Verdichtungszone verankert. Die Kontraktion wird, wie in der quergestreiften Muskulatur, durch eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen-Konzentration bedingt. In der glatten Muskulatur besteht aber die Besonderheit, dass die Ca^{2+} -Ionen überwiegend an Myosinfilamente binden (im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur, wo die Ca^{2+} -Ionen an den Begleitproteinen am Aktinfilament ansetzen) (Lüllmann-Rauch, 2012). Für die glatte Muskelzelle sind drei Phänotypen beschrieben (Rensen et al., 2007). Neben dem klassischen kontraktilen glatten Muskelzelltyp existiert noch der synthetische Typ (Abb. 2). Dieser besitzt im Unterschied zum kontraktilen Typ eine eher rhomboide Zellform mit einem hohen Gehalt an Organellen zur Proteinsynthese. Bei Zellkulturuntersuchungen zeigt der synthetische Typ eine höhere Wachstumsrate und Migrationsaktivität als der kontraktile Typ. Zwischen diesen beiden glatten Muskelzelltypen besteht noch ein großes Spektrum aus intermediären Zelltypen. Eine Besonderheit stellt die Tatsache dar, dass diese Phänotypen einen „switch“ in den jeweils anderen Phänotyp durchführen können. Dies ist bedingt durch äußere Faktoren wie veränderte Drücke, Scherkräfte oder Variationen in der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (Rensen et al., 2007).

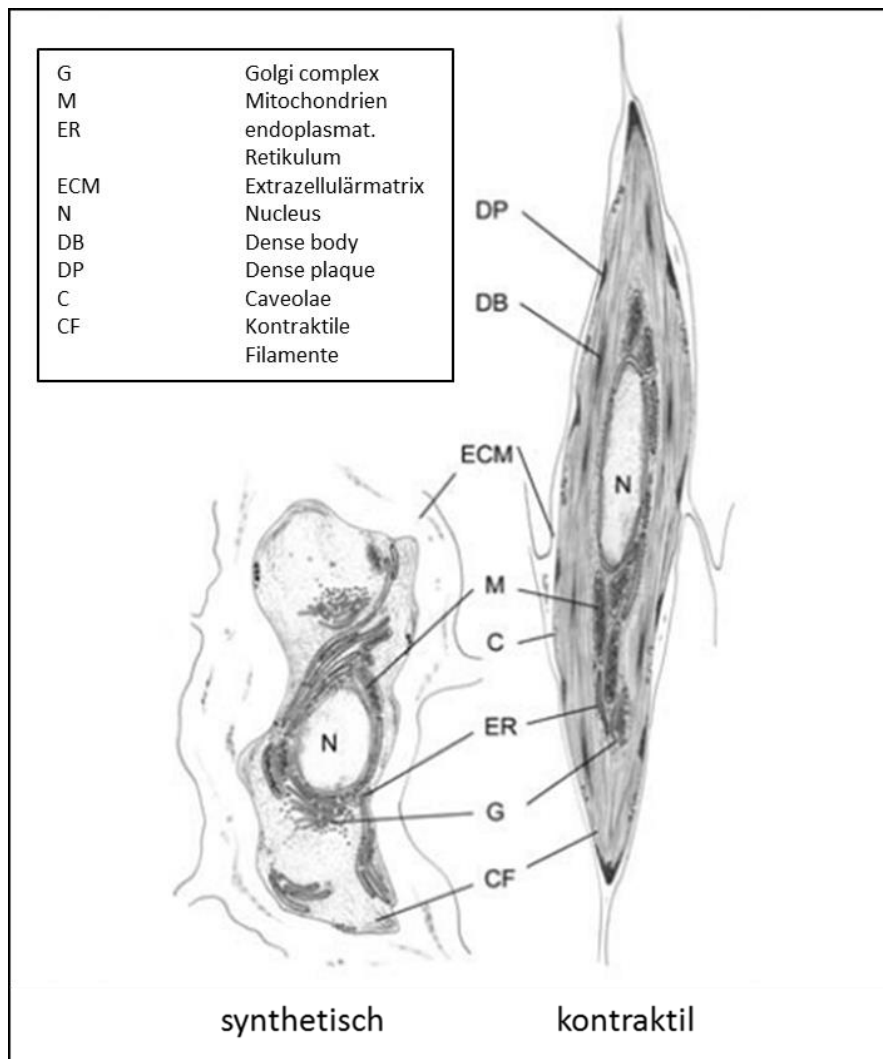


Abb. 2: Ultrastruktur von synthetischen und kontraktiven glatten Muskelzellen nach Rensen et al (Rensen et al., 2007).

Der synthetische Zelltyp ist durch eine rhomboide Zellform mit einem hohen Gehalt an Organellen zur Proteinsynthese charakterisiert. Der kontraktile Zelltyp weist dagegen eine spindelförmige Form mit einem geringeren Gehalt an Organellen zur Proteinsynthese auf.

1.1.4 Innervation

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) arbeitet, bedingt durch das enterische Nervensystem (ENS), weitgehend autonom. Die Innervation der enterischen, glatten Muskulatur erfolgt ebenfalls durch das ENS (intrinsische Innervation), wobei hier speziell der Plexus myentericus (Auerbach-Plexus) und der Plexus submucosus (Meißner-Plexus) zu nennen sind (siehe Kap. 1.2) (Surprenant, 1994). Zudem existieren sogenannte Schrittmacherzellen, die interstitiellen Zellen von Cajal. Ihre Funktion

wird als Art Vermittlerrolle zwischen glatten Muskelzellen und dem ENS gesehen (Lüllmann-Rauch, 2012).

Aber auch der Gesamtorganismus nimmt über den Parasympathikus und den Sympathikus Einfluss auf die GIT-Funktion (extrinsische Innervation) (Silbernagel, 2012). Daneben spielen auch viszerosensible Afferenzen von Mechanorezeptoren (Dehnungsreize im Darmkanal) eine Rolle bei der Innervation der glatten Muskulatur (von Engelhardt, 2009). Auch endokrine Faktoren wie zum Beispiel Gastrin, Cholecystokinin, Sekretin, GIP oder Motilin, haben einen Einfluss auf die glatte Muskulatur und damit letztendlich auf die Motilität im GIT (Silbernagel, 2012).

1.1.5 Glattmuskulärer Apparat

Der kontraktile Apparat der glatten Muskelzelle besteht aus Aktin- und Myosinfilamenten. Dieses Filamentsystem ist in ein zweites eingelagert, welches das Zytoskelett bildet (Draeger et al., 1990). Beide Filamentsysteme sind in sogenannten Verdichtungszone(n) (cytoplasmic dense bodies) und Anheftungsplaques (attachment plaques) verankert. Die Kontraktion erfolgt durch eine Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente. Durch die große Verschieblichkeit der Filamente kommt es zu einer Formveränderung der glatten Muskelzelle von spindelförmig zu kugelig. Die Längenänderung fällt bei der glatten Muskelzelle wesentlich größer aus als bei der Skelettmuskelzelle. Das Ca^{2+} -bindende Element in der glatten Muskulatur ist Calmodulin. Nach der Aktivierung und damit Ca^{2+} -Freisetzung kommt es nach der Überschreitung eines Grenzwertes zur Bildung des Ca^{2+} -Calmodulin-Komplexes. Dieser Komplex aktiviert die Myosin-leicht-Ketten-Kinase (MLCK), welche ATP spaltet und den entstandenen Phosphor auf die leichten Peptidketten des Myosinkopfes überträgt. Caldesmon (siehe Kap. 1.1.6) wird ebenfalls phosphoryliert und vom Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex gebunden, was zur Freigabe der blockierten Myosinbindungsstellen am Aktinmolekül führt. Die Myosinköpfe können somit an Aktin binden und eine ATPase Aktivität entwickeln. Dadurch kommt es zur Kontraktion. Sinkt der Ca^{2+} -Spiegel bzw. steigt die Phosphataseaktivität, kommt es zur Dephosphorylierung der MLCK und des Caldesmon und damit zur Relaxation (Silbernagel, 2012).

1.1.6 Caldesmon

Caldesmon (CaD) wurde erstmalig 1981 von Sobue et al. isoliert und als Aktin- und Ca^{2+} -Calmodulin-bindendes Protein beschrieben (Sobue et al., 1981; Sobue und Sellers, 1991). Klassifiziert wurden bisher zwei Isoformen des Caldesmon. Das h-CaD (high molecular weight Caldesmon) in glatten differenzierten Muskelzellen und das l-CaD (low molecular weight Caldesmon), welches zunächst nur in Nicht-Muskelzellen nachgewiesen werden konnte (Sobue et al., 1981). l-CaD wurde später in fast allen nichtmuskulären Zelltypen entdeckt (Bretscher und Lynch, 1985), aber auch in nicht differenzierten glatten Muskelzellen (Huber, 1997). Generell wird angenommen, dass h-CaD eine Komponente des kontraktilen Apparates der glatten Muskelzelle ist und l-CaD ein Zytoskelettprotein darstellt (Huber, 1995). Wechselt der Phänotyp durch die Kultivierung glatter Muskelzellen vom kontraktilen zum synthetischen, fibroblastenähnlichen Phänotyp, kommt es auch zu einer Verschiebung von h-CaD zu l-CaD (Owada et al., 1984; Dingus et al., 1986). Als Komponente des kontraktilen Apparates hat h-CaD die Funktion die Myosin-ATPase-Aktivität zu hemmen (Ngai und Walsh, 1984). Neben der Fähigkeit an Aktin zu binden, interagiert h-CaD außerdem mit Myosin, Calmodulin und Tropomyosin (Huber, 1995). Es besteht eine synergistische Interaktion zwischen h-CaD und Tropomyosin, welche zu einer Affinitätssteigerung zu den Aktinfilamenten führt (Graceffa, 1987; Chalovich et al., 1995). Solange eine Interaktion zwischen h-CaD, Aktin und Tropomyosin besteht, ist die Myosin-ATPase-Aktivität gehemmt. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration führt zur Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex Bildung und damit zur Phosphorylierung des h-CaD durch die MLCK. Im phosphorylierten Zustand fällt nun die Hemmung der Myosin-ATPase Aktivität weg und es kommt zur Muskelkontraktion (Matsumura und Yamashiro, 1993; Wang, 2008).

1.2 Das enterische Nervensystem

1.2.1 Definition

Das enterische Nervensystem (ENS) stellt ein ausgeprägtes Netzwerk von Neuronen und Gliazellen im GIT dar. Annähernd 400 - 600 Millionen enterische Neurone sind im humanen Darm (Furness, 2012) und schätzungsweise 1,2 Millionen im Darm der

Maus gefunden worden (Gianino et al., 2003). Aufgrund dieser hohen Anzahl an Nervenzellen wird das ENS auch als „Brain within the gut“ bezeichnet (Wood, 1999). Über die drei Effektorsysteme, bestehend aus glatter Muskulatur, Mukosa und Gefäßsystem, hat das ENS Einfluss auf die Motilität, Resorption und Sekretion im GIT (Surprenant, 1994).

1.2.2 Anatomie

Die größte Anzahl an Nervenzellen befindet sich, neben dem zentralen Nervensystem, im GIT (Wedel et al., 1999). Im Zuge der gastrointestinalen Entwicklung kommt es zur Auswanderung von sogenannten neural crest cells (NCC) aus dem Neuroektoderm in den GIT. Diese Zellen sind die Grundlage für die spätere Entwicklung aller Neurone und Gliazellen im ENS (Yntema und Hammond, 1954). Die Besiedelung des Darmtraktes mit NCC beginnt zunächst im Vorderdarm und setzt sich dann in rostrokaudaler Richtung fort (Young et al., 2003; Wallace und Burns, 2005). Diese Zellen durchlaufen im Zuge der Migration in den GIT durch den Einfluss verschiedener neurotropher Faktoren wie z.B. dem glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) verschiedene Phasen der Proliferation und Differenzierung (Heuckeroth et al., 1998). Die einzelnen Nervenzellen lagern sich zu Nervenzellaggregaten zusammen und werden im peripheren Nervensystem als Ganglien bezeichnet (Lüllmann-Rauch, 2012). Durch die Ausbildung interganglionärer Nervenfasern, die die einzelnen Ganglien verbinden, entstehen Plexus. Bereits 1857 wurde von Meissner der Plexus submucosus in der gleichnamigen Tela submucosa beschrieben (Meissner, 1857). 1862 beschrieb Auerbach den im Septum intermusculare zwischen Ring- und Längsmuskulatur auftretenden Plexus myentericus (Auerbach, 1862).

Wallace und Burns zeigten 2005, dass die NCC nach der Ausbildung des Plexus myentericus zentripetal weiter wandern und den Plexus submucosus bilden (Wallace und Burns, 2005). Der Plexus myentericus bildet zusammen mit dem Plexus submucosus den prominentesten Bestandteil des intramuralen Nervensystems. Neben diesen finden sich eine Reihe verschiedener Plexus in den einzelnen Wandschichten des Darmtraktes. So existieren der Plexus muscularis longitudinalis, der Plexus muscularis circularis, Plexus muscularis mucosae, der Plexus mucosus

subglandularis sowie der Plexus mucosus periglandularis. Der Plexus submucosus lässt sich noch einmal unterteilen in die Plexus submucosus externus, -internus und extremus (Abb. 3) (Wedel et al., 1999).

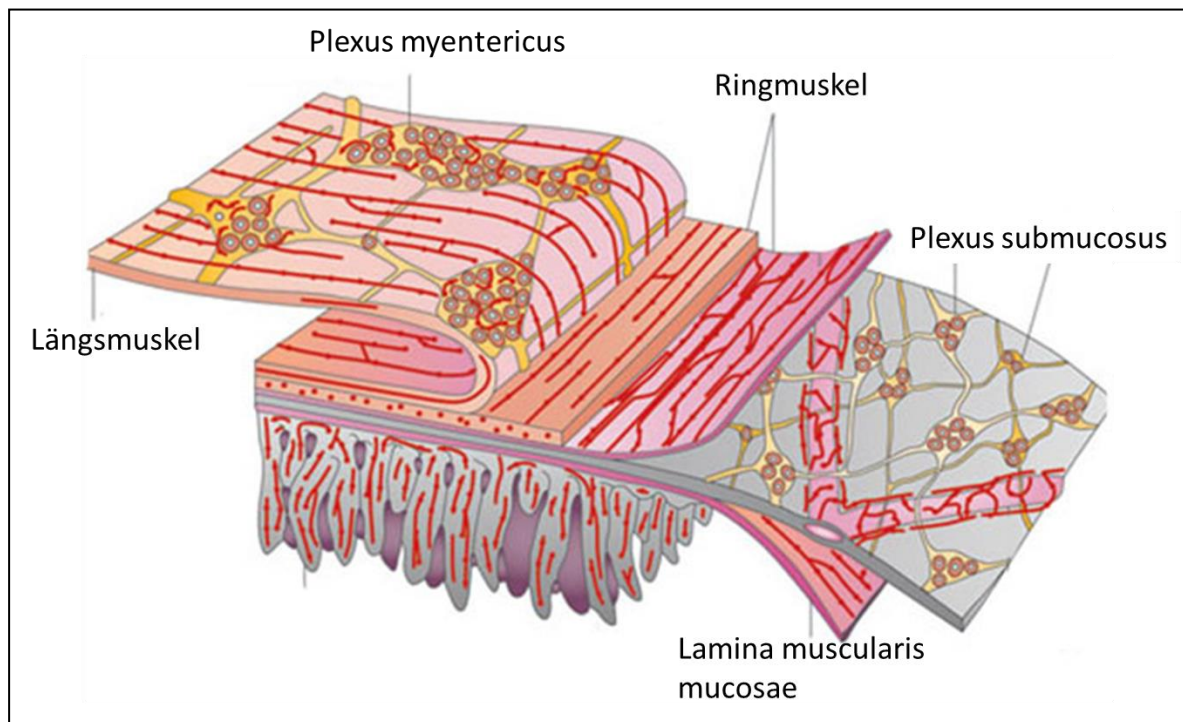


Abb. 3: Das enterische Nervensystem nach Furness (Furness, 2012).

Der Plexus myentericus befindet sich zwischen der Längs- und Ringmuskulatur, während der Plexus submucosus in der Tela submucosa erkennbar ist.

1.3 Motilität und Motilitätsstörungen

Die gastrointestinale Motilität kann als Funktionskreis verstanden werden, in dem die Initiatoren (ENS) Einfluss über Mediatoren (Neurotransmitter) auf Effektoren (glatte Muskelzellen) nehmen. Dieser funktionelle Ablauf kann durch äußere und innere Einflüsse moduliert werden. Ausfälle bzw. Veränderungen einzelner Komponenten wirken sich somit auf die Motilität aus und können schlussendlich in einer Motilitätsstörung münden.

Die intestinale Motilität wird hauptsächlich autonom durch den Plexus myentericus reguliert. Der Plexus submucosus hat regulierenden Einfluss auf den Ionen- und Flüssigkeitstransport, den Blutfluss in der Tunica mucosa sowie die Sekretion und

Resorption (Furness, 2000; Furness, 2012). Ein weiterer wesentlicher Faktor für den funktionellen Ablauf der gastrointestinalen Motilität ist der Informationsaustausch zwischen ENS und ZNS, die sogenannte Hirn-Darm-Achse (Holzer et al., 2012). Dieser Informationsaustausch wird durch verschiedene Systeme vermittelt, die damit Einfluss auf die Motilität nehmen. Hierzu gehören: 1. vagale bzw. spinale Afferenzen sowie der Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus, 2. Zytokine (Wittig und Zeitz, 2003) und 3. endokrine Botenstoffe (Ahlman und Nilsson, 2001).

Des Weiteren nehmen die „interstitiellen Zellen von Cajal“ (Cajal, 1893) eine wichtige Rolle als Schrittmacherzelle für die Muskelzellen ein (Thuneberg, 1982; Rumessen und Vanderwinden, 2003) und können somit ebenfalls zu den Initiatoren gezählt werden. Diese Zellen erzeugen zum einen elektrische Schrittmacherpotentiale (Ward et al., 1994), zum anderen dienen sie der Erregungsübertragung zwischen den Muskelzellen mittels „gap junctions“ (Burns et al., 1996). Daraus lassen sich verschiedene Faktoren für die Entstehung von Motilitätsstörungen im Bereich der Initiatoren ableiten. Neben einem Mangel an Cajal-Zellen können Innervationsstörungen, bedingt durch eine Hypo- oder Aganglionose, als Ursache für Motilitätsstörungen angesehen werden (Wedel et al., 2002).

Auch Störungen der anderen Komponenten des Funktionskreises, den Mediatoren (Böttner et al., 2012) und Effektoren (Böttner und Wedel, 2012), können Auswirkungen auf den funktionellen Ablauf der gastrointestinalen Motilität haben.

Die Bedeutung einer intakten intestinalen Motilität wird deutlich, wenn man sich vor allem im höheren Alter die hohe Prävalenz an Erkrankungen, die mit Motilitätsstörungen einhergehen, vergegenwärtigt: etwa 40% der über 60jährigen leiden an chronischer Obstipation (Gattuso und Kamm, 1993). Aber auch genetisch bedingte Erkrankungen im Kleinkindalter, wie Morbus Hirschsprung, spielen eine wichtige Rolle (Parisi, 1993). Auch in der Tiermedizin zeigen Erkrankungen wie der Megaösophagus beim Hund (Ryer und Ryer, 1980) oder das Megakolon bei der Katze (Bertoy, 2002) die Wichtigkeit einer funktionierenden Motilität.

1.4 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)

GDNF stellt einen neurotrophen Faktor dar, der im Darmmesenchym exprimiert wird und chemotaktisch auf enterische Neural crest cells wirkt (Natarajan et al., 2002).

Neurotrophe Faktoren, neben GDNF auch z.B. Neurturin, NT-3 und BMP, haben einen starken Einfluss auf das Überleben, die Differenzierung und die Erhaltung von enterischen Nervenzellen. Eine Beteiligung hierbei ist einer Vielzahl von neurotrophen Faktoren zuzuschreiben (Gershon, 1997), wobei besonders GDNF als Schlüssel-Neutrophin für das ENS hervorzuheben ist. GDNF gehört zur TGF- β Superfamilie und wurde ursprünglich aus dem Überstand einer glialen Zelllinie B49 isoliert und mit der Fähigkeit charakterisiert, das Überleben von kultivierten dopaminergen Neuronen zu fördern (Lin et al., 1993). GDNF bindet typischerweise an den GDNF-family Rezeptor $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$) und vermittelt eine Signaltransduktion über den „re-arranged during transfection“ (RET) Rezeptor (Airaksinen et al., 1999; Airaksinen und Saarma, 2002). Die Bedeutung von GDNF wurde deutlich, als der Phänotyp der „knock-out“ Tiermodelle von Komponenten des GDNF-Systems analysiert wurde. Ablation von GDNF führt zu einer totalen Aganglionose, einem kompletten Verlust enterischer Neurone im Dünn- und Dickdarm (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996). Ebenfalls an „knock-out“ Mäusen, bei denen die Rezeptoren GFR $\alpha 1$ und RET fehlen, konnte ein ähnlicher Phänotyp gezeigt werden, der in der Ausprägung dem morphologischen Bild des Morbus Hirschsprungs ähnelt (Schuchardt et al., 1994; Uesaka et al., 2007). Dies bestätigt die essentielle Rolle des GDNF Systems in der Regulation von Proliferation und Differenzierung enterischer Neurone. Als Kontrast hierzu kommt es bei einem Anstieg des GDNFs zu einer Hyperganglionose (Qiao et al., 2009; Wang et al., 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass GDNF positive Effekte auf das Neuritenwachstum, die Differenzierung sowie das Überleben von enterischen Nervenzellkulturen hat (Schäfer et al., 1997; Schäfer und Mestres, 1999). Als Quelle für das GDNF wird die enterische Muskulatur, entsprechend dem „neurotropher-Faktor-Konzept“ im ZNS, postuliert (Böttner et al., 2013). Dieses Konzept besagt, dass das innervierte Gewebe selbst neurotrophe Faktoren produziert und damit dem innervierenden Gewebe ein Signal gibt, welches den neuronalen Zelltod verhindert (Oppenheim, 1991; Korsching, 1993). Eine aktuelle Studie konnte den Nachweis von GDNF in der Ring- und Längsmuskulatur im distalen Kolon des Menschen liefern (Barrenschee et al., 2013). Demnach würde die enterische Muskulatur GDNF produzieren und somit das Überleben der Neurone in adulten Individuen sicherstellen.

1.5 Divertikelkrankheit

Die Divertikelkrankheit (DIV) gehört zu den 5 wichtigsten gastrointestinalen Erkrankungen der westlichen Zivilisation. Sie tritt mit einer Inzidenz von 2,5 /100.000 pro Jahr auf. Die Pathogenese ist nicht vollständig verstanden, ein multifaktorielles Geschehen wird angenommen. Klassische pathogenetische Konzepte führen steigendes Alter, eine rohfaserarme Diät, eine Bindegewebsschwäche und genetische Komponenten als Risikofaktoren an (Simpson et al., 2002). Neue pathogenetische Konzepte beschreiben neben einer gestörten intestinalen Motilität (Painter et al., 1965; Parks und Connell, 1969; Bassotti et al., 2001) ein gestörtes enterisches Neurotransmittersystem (Milner et al., 1990; Golder et al., 2007; Simpson et al., 2009). Außerdem konnte eine enterische Neuropathie, die unter anderem mit einer Hypoganglionose einhergeht, gezeigt werden (Bassotti et al., 2001; Golder et al., 2003; Knowles et al., 2010; Wedel et al., 2010). Auch eine enterische Myopathie wurde beschrieben (Painter und Burkitt, 1975; Stelzner, 1976; Hellwig et al., 2013). Diese ist sowohl durch strukturelle als auch durch funktionelle Veränderungen der glatten Muskulatur charakterisiert (Hellwig et al., 2013) und geht mit einem mRNA-Expressionsdefizit verschiedener glattmuskulärer kontraktile Komponenten, wie z.B. Caldesmon, einher (Hellwig et al., 2013). Daneben konnten auch Veränderungen der mRNA-Expression neurotropher Faktoren bei Patienten mit DIV gezeigt werden (Böttner et al., 2013). Vor allem ein von Böttner et al. (2013) nachgewiesenes Expressionsdefizit des neurotrophen Faktors GDNF bei der Divertikelkrankheit könnte helfen, das beobachtete Nervenzelldefizit zu erklären.

2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die intestinale Motilität ist ein Ergebnis des Zusammenspiels von intestinalen glatten Muskelzellen (ISMC) als Effektoren und dem enterischen Nervensystem (ENS) als Initiatoren. Störungen bzw. Schäden in einem dieser Kompartimente können zu Motilitätsstörungen bzw. intestinalen Erkrankungen führen. Der neurotrophe Faktor GDNF spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des ENS. Die Quelle des GDNF konnte allerdings bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Daher sollte in dieser Arbeit die intestinale glatte Muskelzelle als Quelle des GDNF identifiziert werden und ein geeignetes Zellkulturmodell für weitere Untersuchungen entwickelt werden. Darüber hinaus ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welches Entwicklungsstadium der Ratte eignet sich, um glatte Muskelzellen zur Kultivierung zu gewinnen?
- Gibt es Unterschiede bezüglich der Expression von GDNF und dessen korrespondierenden Rezeptoren in den verschiedenen postnatalen Stadien?
- Kann mittels des glattemuskulären Markers Caldesmon ein kontraktiler Phänotyp der kultivierten glatten Muskelzellen nachgewiesen werden?
- Exprimieren kultivierte ISMCs weiterhin GDNF und dessen korrespondierende Rezeptoren?
- Gibt es Unterschiede bezüglich Kultivierungsdauer und Kulturmedium?
- Wie verhält sich eine enterische Nervenzellkultur bei Supplementierung von GDNF?
- Wie verhält sich eine enterische Nervenzellkultur, die auf einem Muskelfeeder ausgesät wurde?
- Liefern die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die ISMCs die Quelle des GDNF darstellen?
- Welche Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese von Motilitätsstörungen liefert die Studie?
- Welche Bedeutung hat die Arbeit in Bezug auf die Divertikelkrankheit?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Nachfolgend in Tabelle 1 sind alle Chemikalien aufgeführt, die in dieser Arbeit zur Verwendung kamen.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Amphotericin	Pan-Biotech, Aidenbach, D
Anilinblau-Orange Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Anilin-Alkohol	Merck, Darmstadt, D
Antikörperdiluent	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aquatex	Merck, Darmstadt, D
Azocarmine G	Merck, Darmstadt, D
B 27 Supplementmix	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Blockserum „Normalserum“	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Citrat	Roth, Karlsruhe, D
DAPI	Roche, Mannheim, D
Depex	Serva, Heidelberg, D
Desoxyribonucleosidtriphosphatase (dNTP`s)	Promega, Madison, U.S.A
3-3'-Diaminobenzidine (DAB)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNase Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Eosin	Merck, Darmstadt, D

Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
FCS	Henke-Sass, Wolf, Tuttlingen, D
GDNF	Peprotech, Hamburg, D
Glutamine	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt, D
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Promocell, Heidelberg, D
HCl-Alkohol	Roth, Karlsruhe, D
Immunmount	Thermo Scientific, Bremen, D
Isomount	Labonord, Templemars, Frankreich
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Minimal Essential Medium (MEM)	Promocell, Heidelberg, D
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Metronidazol	Ratiopharm, Ulm, D
Methylbenzoat	Roth, Karlsruhe, D
Neurobasalmedium	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Normal goat serum	Dako, Glostrup, Dänemark
PCR Puffer	Promega, Madison, U.S.A
PDL	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Pen-Strep-Lösung	Gibco Life Technologies, Karlsruhe, D
Phosphorwolframsäure	Merck, Darmstadt, D
Polylysin/Laminin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Refobacin	Merck, Darmstadt, D
RNase freies Wasser	Macherey-Nagel, Düren, D
Tri-Chlor-Methan	Riedel de Haen, Seelze, D

Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau	Merck, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Roth, Karlsruhe, D

3.1.2 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Geräte und in Tabelle 3 aufgelisteten Verbrauchsmaterialien wurden in dieser Arbeit benutzt.

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte

Produkt	Name	Hersteller
Brutschrank	Forma Scientific	Labotect, Göttingen, D
Digitalkamera	Axiocam	Zeiss, Jena, D
Digitalkamera	digital slight	Nikon, Tokio, Japan
Durchlicht-Mikroskop	eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
LCM-Instrument		Carl Zeiss MicroImaging München, D
Kühlschrank -20°C	Electronic	Bosch, Gerlingen, D
Mikrowelle		Panasonic, Hamburg, D
Pipetten (1, 10, 100, 1000 µl)	Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, D
Umluftschrank		Memmert, Schwabach, D

Rüttler	Promax 2020	Heidolph, Schwabach, D
Thermocycler	ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Ultrathorax-Gerät	Polytron PT 3000	Luzern, Schweiz
Wasserbad		Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge	Minifuge 2	Heraeus Christ, Osterode, D
	Biofuge	Heraeus Christ, Osterode, D
Zählkammer	Neubauer	Brandt, Wertheim, D

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
AMPLIseal	Greiner, Frickenhausen, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
HistoBond®	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Insulinkanülen	Eydam, Kiel, D
Objektträger	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshafen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt, D
Probengefäße (Tubes 1,5 ml)	Eppendorf, Sarstedt, D
96 Well Platten	Greiner Bio-one, Monroe, U.S.A
Zellkulturschalen	Eppendorf, Sarstedt, D
Zellkulturplatten	Eppendorf, Sarstedt, D

3.1.3 Kits

Die für diese Arbeit verwendeten Kits werden folgend in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Kits

Produkt	Hersteller
ABC Elite Kit	Vector Laboratories, Eching, D
Liquid DAB+ (Diaminobenzidin)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Nucleospin XS-Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
Nucleospin RNA II-Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
qPCR Master Mix Plus	Eurogentec, Köln, D

3.1.4 Antikörper

Die für die Immunhistochemie verwendeten Primär-und Sekundärantikörper sind folgend in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Wirtsorganismus	Hersteller
primär		
Anti-CALD1	Rabbit	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Anti- α -SMA	Mouse	Dako, Hamburg, D
Anit-Tubulin β III	Mouse	Millipore, Temecula, CA

Sekundär-LSAB

Alpha E 0432	goat, anti-rabbit, biotyniliert	Dako, Hamburg, D
--------------	------------------------------------	------------------

Sekundär-Fluoreszenz

Alexa Fluor 546	goat, anti-mouse	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexs Fluor 488	goat, anti-rabbit	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.5 Puffer und Lösungen

Folgend in Tabelle 6 sind in dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Menge/Herstellung
Puffer		
TBS Puffer (pH 7,6)		9 Teile H ₂ O _{bidest}
		1 Teil TBS-Stammlösung:
	Tris-Base	10 mM TRIS
	Natriumchlorid	50 mM NaCl
Zitronesäurepuffer (pH 6,1)	Citrat	10 mM
	H ₂ O _{dest}	1 l

PBS Puffer (pH 7,2)	NaCl	16,00 g [273 mM]
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	2,88 g [12,8 mM]
	KH ₂ PO ₄	0,48 g [3,5 mM]
	KCl	0,40 g [5,3 mM]
	H ₂ O _{bidest}	ad 2 l

Lösungen

MEM +Antibiose	Fertiglösung	500,0 ml
	PS-Lösung (Penicillin-Streptomycin)	6,0 ml
	Metronidazol 500 mg/ml	1,0 ml
	Refobacin (40 mg/ml)	0,5 ml
HBSS Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Fertiglösung	500,0 ml
Neurobasalmedium	Fertiglösung	500,0 ml
	Glutamine	1,25 ml
	PS-Lösung	6,0 ml
	B27 Supplementmix	10,0 ml
H ₂ O ₂ -Lösung final 3%	30 % H ₂ O ₂	20,0 ml
	H ₂ O _{bidest}	180,0 ml

3.1.6 Nukleotide und Wachstumsfaktoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Nukleotide und Wachstumsfaktoren sind wie folgt in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Nukleotide und Wachstumsfaktoren

Produkt	Hersteller
Nukleotid	
Primer	GE Healthcare, Freiburg, D
Protein	
GDNF 100 µg/ml	PeptoTech, Hamburg, D

3.1.7 Enzyme

Enzyme, die in dieser Arbeit zur Verwendung kamen, sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Produkt	Hersteller
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Desoxyribonuklease I	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, U.S.A
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

3.1.8 Gewebe

3.1.8.1 Rattendarm

Für die vorliegenden Experimente am Rattenvollwandgewebe wurde der Dünn- und Dickdarm von Wistarratten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel der Entwicklungsstadien Postnataltag 0 (P0), P2, P6, P21 sowie von adulten Tieren verwendet.

3.1.8.2 Zellkultur

Für die vorliegenden Zellkulturstudien wurden Därme von Wistar- und Sprague Dawley-Ratten des Entwicklungsstadiums P2/P3 isoliert.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zellkultur enterischer Neurone

Zur Kultivierung enterischer Neurone wurden Därme von zwei bis drei Tage alten Wistar- und Sprague Dawley-Ratten isoliert und in Minimal Essential Medium (MEM) mit Antibiotika (Refobacin 40 mg/ml + Metronidazol 500 mg/ml) auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Darm vom Mesenterium befreit und die Tunica muscularis von der Tunica mucosa und Tela submucosa von distal nach proximal abpräpariert. Zur Isolierung der myenterischen Nervenplexus wurde die Tunica muscularis in 900 µl Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) + 100 µl Kollagenase-SL (≥ 1250 collagen digesting units (CDU) / ml) bei 37°C im Brutschrank für 2 h verdaut. Die abgelösten Nervenzellplexus, die sich als kleine Netze darstellten, wurden dann mittels einer Pipette in 1,5 ml große, mit MEM gefüllte Eppendorfgefäße überföhrt und auf Eis gelagert. Die Plexusnetze wurden anschließend für 5 min bei 184 g zentrifugiert. Daraufhin wurden diese zu Einzelzellen verdaut, indem sie mit 500 µl 0,25 % Trypsin-EDTA vermischt und für 1,5 min bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden 500 µl fetales Kälberserum (FCS) hinzugegeben und die Plexusstücke langsam durch eine Insulinkanüle gezogen. 5 µl der Zellsuspension wurden mit 5 µl Trypanblau vermengt und für 5 min bei 184 g zentrifugiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in der Neubauer Zählkammer, einem Hämozytometer. Es folgte die Zählung und Addition der Zellen von 16 kleinen Eckquadraten (16 kleine Eckquadrate entsprechen einem Großquadrat). Aus der errechneten Summe wurde der Mittelwert (MW) bestimmt. Die Zellzahl in der Suspension konnte dann anhand folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \text{MW aus 2 Großquadraten} / (\text{gezählte Fläche} \times \text{Kammerhöhe} \times \text{Verdünnung})$$

Für die Beschichtung der Deckgläser wurde 100 µl Poly-D-Lysin (PDL) pro Deckglas verwendet und für 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dreimaligem Spülen mit PBS-Puffer wurden die Deckgläschen für 30 min zum Trocknen in den

Brutschrank gelegt. Von der Laminin Fertiglösung (1 mg/ml) wurden 5 µg/ml in Medium angesetzt und 2 h im Brutschrank bei 37°C gelagert, mit H₂O_{monodest} dreimal gespült und für 6 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Es wurden 100.000 Einzelzellen auf ein mit PDL und Laminin beschichtetes Deckgläschen ausgesät und in 1 ml definiertem Medium, welches aus Neurobasalmedium + B27 bestand, kultiviert. Die Stimulation zum Wachstum der Zellen erfolgte durch Zusatz von Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), wobei Konzentrationen von 0 und 50 ng/ml verwendet wurden. Für die Immunzytochemie betrug die Kultivierungsdauer 7 Tage. Das Nährmedium wurde dreimal pro Woche erneuert, um Stoffwechselabbauprodukte der Zellen zu beseitigen.

3.2.1.2 Zellkultur enterischer Muskelzellen

Zur Kultivierung enterischer Muskelzellen wurden Därme von zwei bis drei Tage alten Wistar- und Sprague Dawley-Ratten isoliert und in MEM + Antibiotika (Refobacin 40 mg/ml + Metronidazol 500 mg/ml) auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Darm vom Mesenterium befreit und die Tunica muscularis von der Tunica mucosa und Tela submucosa von distal nach proximal abpräpariert. Zur Isolierung der enterischen Muskelzellen wurde die Tunica muscularis in 900 µl HBSS + 100 µl Kollagenase-SL (≥1250 collagen digesting units (CDU) / ml) bei 37°C im Brutschrank für 2 h verdaut. Die abgelösten Muskelstücke wurden dann mit 0,25% Trypsin-EDTA bei 37°C 15 min lang im Brutschrank inkubiert, aufgeschüttelt und erneut über 30 min inkubiert.

Anschließend wurden 500 µl FCS hinzugegeben und die Muskelzellen für 10 min bei 600 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Medium, bestehend aus MEM, 10 % FCS, 2 nM Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und 0,2 % Amphotericin, resuspendiert. Es wurden 130.000 Einzelzellen auf ein unbeschichtetes Deckgläschen ausgesät und in 1 ml eines definierten Mediums bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Immunzytochemie und Fluoreszenzimmunzytochemie betrug die Kultivierungsdauer 7 Tage in MEM, 10 % FCS, 2 nM Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und 0,2 % Amphotericin (serumhaltiges Vollmedium). Für die mRNA Expressionsstudien betrug die Kultivierungsdauer entweder 7 oder 14 Tage im oben genannten serumhaltigen Vollmedium oder alternativ in Neurobasalmedium + B27 (serumfreies

Hungermedium). Das Nährmedium wurde dreimal pro Woche erneuert, um Stoffwechselabbauprodukte der Zellen zu beseitigen.

3.2.1.3 Kokultur enterischer Nerven- und Muskelzellen

Für die Kokulturen enterischer Nerven- und Muskelzellen wurden die Muskelzellen entsprechend Kap. 3.2.1.2 über 7 Tage in serumhaltigem Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden auf die bestehende Kultur 100.000 enterische Nervenzellen entsprechend Kap. 3.2.1.1 ausgesät und in 1 ml definiertem Medium, welches aus Neurobasalmedium + B27 bestand, über 7 Tage kultiviert. Das Nährmedium wurde dreimal pro Woche erneuert, um Stoffwechselabbauprodukte der Zellen zu beseitigen.

3.2.2 mRNA-Expressionsstudien

3.2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen enterischer Muskeln

Die Isolierung der RNA aus den Muskel-Zellkulturen wurde mit dem Nucleospin XS-Kit nach Angaben des Herstellers (Machery & Nagel) durchgeführt. Hierbei wurden die ca. 130.000 Zellen pro Kulturschälchen in 350 µl Lysis-Puffer des Kits, der mit 3,5 µl Mercaptoethanol versetzt wurde, gelöst und zur Homogenisierung mehrfach durch eine 0,9 mm große Kanüle passagiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine vom Hersteller mitgelieferte Säule gegeben und abzentrifugiert, um nicht benötigtes Zellmaterial zu entfernen. Das Filtrat wurde mit 350 µl 70 %igem Ethanol gemischt und auf eine RNA-bindende Säule gegeben, welche anschließend nach dem Waschprotokoll des Herstellers gereinigt wurde. Mittels RNase freiem H₂O wurde ein finales Probenvolumen von 12 µl eluiert.

Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde in Eppendorfgefäßen bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.2.2.2 RNA-Isolierung aus Vollwandgewebe

Die Isolation der RNA aus Vollwandgewebe des Rattendarms wurde mit Hilfe von Trizol durchgeführt. 50 – 100 mg Vollwandgewebe wurden mit 1 ml Trizol versetzt, mit einem Ultrathorax-Gerät homogenisiert und in Eppendorfgefäße überführt. Nach

Zentrifugieren bei 12000 *g* und 4 °C über 10 min wurde der Überstand mit 200 µl Tri-Chlor-Methan vermischt, um die Phasen aufzutrennen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 12000 *g* und 4°C über 15 min wurde die wässrige Phase in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, um die freie RNA zu binden und auszufällen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 12000 *g* und 4 °C über 10 min wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet 2-3 x mit 75 %igem Ethanol gewaschen.

Mittels RNase freiem Wasser wurde zu einem finalen Volumen von 50 µl eluiert. Daraufhin wurde die RNA Konzentration gemessen, sodass 400 ng RNA für die reverse Transkription asserviert werden konnten. Die auf diese Weise gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung in Eppendorfgefäßen bei –80°C gelagert.

3.2.2.3 Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription (RT) dient der Umschreibung von messenger RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA), um eine *in vitro* Vervielfältigung der DNA mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion) zu ermöglichen. Die Transkription erfolgt mittels reverser Transkriptase. Reverse Transkriptasen sind Enzyme, die die Umschreibung von RNA zu cDNA katalysieren. Dazu wird zunächst ein einzelner RNA-DNA-Hybridstrang durch eine RNA abhängige DNA Polymerase (Reverse Transkriptase) synthetisiert. Durch den RNase-H Anteil des Proteins wird die RNA abgebaut und mittels einer DNA abhängigen DNA-Polymerase der DNA Einzelstrang zu einem Doppelstrang komplettiert. Als Starter-Molekül wird ein random-Hexamer-Primer (6 bp DNA Fragmente mit zufälliger Basenpaarung) eingesetzt. Ein Primer ist ein Oligonukleotid, das als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme dient. Diese Nukleotidsequenzen werden vorab bestimmt und synthetisch hergestellt. Für die erste Verknüpfung benötigen DNA-Polymerasen eine Hydroxygruppe als Startpunkt. Primer stellen mit ihrem 3'-OH-Ende eine passende Hydroxyfunktion dar. Als Produkt erhält man eine relativ stabile cDNA, die bei -20°C gelagert wird.

Tabelle 9: Arbeitsprotokoll für den DNase Verdau und die cDNA Synthese mittels reverser Transkription

Substanz	Menge [µl]	Durchführung	Dauer	Zweck
RNA in H ₂ O	12	Inkubation bei Raumtemperatur	15 min	Verhinderung der Amplifizierung genomischer DNA
DNase Puffer	1,5			
DNase	1,5			
EDTA [20 mM]	1,5			
		Thermocycler	10 min, 70°C	Verhinderung Degradierung von Nukleinsäuren
				Denaturierung der Sekundärstruktur u. Inaktivierung der DNase
5x RT - Puffer (one step reaction)	6			
DTT [0,1 mM]	3			Supprimierung der RNase - Aktivität
dNTP's [19 mM]	1,5			Sequenzierung
N6 Primer (250 ng/µl)	1,5			Primer
SuperScript RT	1,5			RNA abhängige DNA Polymerase
	30 total	Thermocycler	10 min, 25°C	Primer Annealing
			50 min, 42°C	Kettenverlängerung Transkription
			15 min, 70°C	Denaturierung der RNA/cDNA – Hybride

3.2.2.4 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qPCR) mittels TaqMan Sonde

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) können spezifische Nukleinsäuresequenzen amplifiziert und quantifiziert werden.

Bei der quantitativen Real-Time PCR handelt es sich wie bei der reversen Transkription um ein *in vitro* Verfahren. Die bei der reversen Transkription hergestellte cDNA dient hierbei als Matrize für die Vervielfältigung.

Um die Nukleinsäuresequenz für einen bestimmten DNA-Abschnitt amplifizieren zu können, müssen die DNA-Sequenzen beider Enden des gewünschten Zielbereiches bekannt sein. Zur Eingrenzung des Zielbereichs verwendet man zwei komplementär zu dem jeweiligen Ende synthetisierte Oligonukleotide (Primer).

Zur DNA-Amplifizierung wird eine spezielle thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, die sogenannte Taq-Polymerase, verwendet. Die Taq-Polymerase wurde erstmals aus dem hitzebeständigen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert.

Um die DNA-Amplifizierung zu ermöglichen, müssen zwei Schritte mehrfach wiederholt werden:

1. 15 Sekunden Denaturierung der DNA bei 95°C
2. 60 Sekunden Hybridisierung des Primers an die DNA und Elongation durch die Taq-Polymerase bei 60°C

Durch die 40fache Wiederholung dieses Zyklus mit Hilfe eines Thermocyclers erfolgt eine theoretisch exponentielle Vermehrung der zwischen den Primern verlaufenden DNA-Sequenz.

Zur Detektion der PCR-Amplifikate wird eine Hydrolyse-Sonde (TaqMan-Sonde) eingesetzt, die aus einem doppelt fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Oligonukleotid besteht. Bei der intakten unhydrolysierten Sonde wird die Fluoreszenz des Fluorochroms am 5'Ende der Sonde (Reporter) von dem Fluorochrom am 3'Ende der Sonde (Quencher) durch Energieübertragung (fluorescence resonance energy transfer, FRET) unterdrückt. Eine Aufhebung der räumlichen Nähe der beiden Fluorochrome hebt die Energieübertragung auf und führt zu einer detektierbaren Fluoreszenz des Reporters.

Bei jedem Zyklus bindet die Sonde sequenzspezifisch an das PCR-Produkt und wird durch die 5'Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Die Folge ist eine Abspaltung des Reporters, wodurch kein FRET mit dem Quencher mehr stattfinden kann. Die daraus resultierende detektierbare Fluoreszenz des Reporters ist proportional zur Menge des PCR-Produktes.

Fluorochrome der TaqMan-Sonde:

Reporter (5'Ende): 6FAM (6-[Carboxy-Fluorescein])

Quencher (3'Ende): TAMRA (Tetramethylrhodamin)

Für die quantitativen mRNA-Expressionstudien wurden die Proben-Tubes der Platte des verwendeten Thermocyclers („ABI PRISM Sequence Detection System“) entsprechend Tabelle 10 bestückt.

Tabelle 10: Protokoll der qPCR

Substanz/Agenz	Menge [µl]	Zweck
cDNA	2	Template
qPCR MasterMix Plus	10	Enthält Taq-Polymerase, Nukleotide und Puffer
Primer sense (100 nM)	0,18	Markiert 5'-Ende der Zielsequenz
Primer antisense (100 nM)	0,18	Markiert 3'-Ende der Zielsequenz
Sonde (10 nM)	0,448	Detektion
H ₂ O (RNase frei)	7,19	

Anschließend wurde die Platte mit einer selbstklebenden Abdeckfolie (AMPLIseal) verschlossen und für 40 Zyklen in das „ABI PRISM Sequence Detection System“

überführt (Dauer ca. 110 min). Die detektierbare Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus durch das ABI PRISM Sequence Detection System gemessen.

Folgende Primer wurden im Rahmen der quantitativen Real-Time PCR verwendet:

Tabelle 11: Verwendete Primer der qPCR

Primer	Orientierung	Sequenz	Beginn der cod. Sequenz
rHPRT	Sense	5'-cgccagcttcctcctcaga-3'	17
	antisense	5'-ggtcataacctgggtcatcact-3'	121
	Sonde	5'-tttcccgcgagccgaccgg-3'	40
GDNF	Sense	5'-gtaggccaggcatgttgca-3'	520
	antisense	5'-ccgtttagcggaatgcttct-3'	621
	Sonde	5'-cgtttttagacgacagcctggtt-3'	566
GFR α 1	Sense	5'-gcgaattgcaggctcagaag-3'	1186
	antisense	5'-gaggcaccagcgagaccat-3'	1286
	Sonde	5'-tgaaatccaatgtgtcgggtagca-3'	1208
RET	Sense	5'-tcccggtgacggtgtatgat-3'	776
	antisense	5'-tgccctcctccgcttaa-3'	877
	Sonde	5'-atgaagacgactccccgccacc-3'	797

Zur Auswertung der RT-qPCR wurde die mRNA Expression von GDNF, GFR α 1 und RET auf die Expression des House-keeping Gens Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) normalisiert. Hierfür musste der Δ Ct-Wert bestimmt werden. Der Δ Ct-Wert gibt die Differenz zwischen dem Ct-Wert des Zielgens und dem Ct-Wert des House-keeping Gens an. Der Ct-Wert (Cycle Threshold) entspricht dem Schwellenwert-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Die relative mRNA Expression zum House-keeping Gen wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$rel. \text{ mRNA Expression} = 2^{-\Delta CT} = 2^{-(Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ HPRT})}$$

3.2.3 Paraffinschnitte

Das Rattenvollwandgewebe, welches mit histologischen Färbemethoden immunhistochemisch und fluoreszenzimmunhistochemisch untersucht wurde, wurde wie in Tabelle 12 dargestellt aufbereitet. Anschließend wurden 6 µm dicke Schnitte erzeugt.

Tabelle 12: Protokoll Paraffineinbettung

Schritt	Substanz	Konzentration	Durchführung	Dauer	Zweck
I	Paraformaldehyd	4 % in PBS	Inkubation bei 6°C	über Nacht	Fixierung
II	Leitungswasser		fließend wässern	2 h	Entfernung von Restbeständen
III			Ränder für Einbettung zuschneiden		glatte Schnittkante im Paraffinblock
IV	aufsteigende Ethanolreihe	50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %	Einlegen, je 2 x	je 30 min	Dehydrierung
Va	Methylbenzoat	100 %	Einlegen	über Nacht	Intermedium
Vb	Methylbenzoat	100 %	Einlegen, 2 x	je 30 min	Intermedium
VI	Paraffin	100 %	Wärmeschränk, bei 60°C, 3 x	je 30 min	Einbettung
VII			Präparat ausrichten, auskühlen lassen		

3.2.4 Histologische Verfahren

3.2.4.1 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE) nach Mayer

Die 6 µm dicken, paraffineingebetteten Rattenvollwandschnitte wurden standardmäßig entsprechend der Tabelle 13 histologisch mit Hämatoxilin-Eosin nach Mayer gefärbt. Im Anschluss wurden die Schnitte lichtmikroskopisch (Nikon 6000) analysiert.

Tabelle 13: Protokoll HE-Färbung

Schritt	Substanz	Konzentration	Durchführung	Dauer	Zweck
I	Xylol		Einlegen, 3 x	10 min	Entparaffinierung
II	Absteigende Ethanolreihe	100 %, 96 %, 90 %, 70 %, 50 %	Einlegen	5 min	Auswaschung des Alkohols
III	H ₂ O _{dest}		Einlegen	5 min	Entparaffinierung
IV	Hämalaun		Einlegen	5 min	Kernfärbung
V	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
VI	Leitungswasser		Fließend wässern	5 min	Bläuung
VII	HCl-Alkohol	0,1 %	Eintauchen, 12 x	3 sec	Differenzierung
VII	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
VIII	Leitungswasser		Fließend wässern	15 min	Bläuung
IX	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
X	Wässriges Eosin +	1 %	Einlegen	4 min	

	Eisessig				
XI	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
XII	aufsteigende Alkoholreihe	70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %	Einlegen, 2 x	5 min	Entwässerung
XIII	Xylol		Einlegen, 2 x	5 min	
XIV	Depex				Eindecken

3.2.4.2 Azan-Färbung

Die 6 µm dicken, paraffineingebetteten Rattenvollwandschnitte wurden standardmäßig entsprechend der Tabelle 14 mittels Azan-Färbung gefärbt. Im Anschluss wurden die Schnitte lichtmikroskopisch (Nikon 6000) analysiert.

Tabelle 14: Protokoll Azan-Färbung

Schritt	Substanz	Konzentration	Durchführung	Dauer	Zweck
I			Brutschrank 60°C	5 h	
II	Xylol		Einlegen, 3 x	10 min	Entparaffinierung
III	Absteigende Ethanolreihe	100 %, 96 %, 90 %, 70 %, 50 %	Einlegen	5 min	Wässern
IV	Anilin- Alkohol	0,1 %	Einlegen	5 min	Kernfärbung
V	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
VI	Azocarmin G + Eisessig		Bei 56- 60°C einlegen	10 min	

VII			Abkühlen	10 min	
VIII	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
IX	Anilin-Alkohol	0,1 %	Einlegen	5 min	Kernfärbung
X	Alkohol + Eisessig	96 %	Auswaschen		Unterbrechung der Kernfärbung
XI	Phosphorwolframsäure	5 %	Einlegen	1 h	Beizen
XII	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
XIII	Anilinblau-Orange-Essigsäure		Einlegen	1 h	Färben
XIV	H ₂ O _{dest}		Abspülen		Spülen
XV	aufsteigende Alkoholreihe	70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %	Einlegen, 2 x	5 min	Entwässerung
XVI	Depex				Eindecken

3.2.5 Immunhistochemische Verfahren

3.2.5.1 Prinzip der Immunhistochemie

Diese Methode, die auf hochspezifischen Antigen-Antikörperreaktionen basiert, dient dem Nachweis von speziellen, vorher durch die Wahl des Primärantikörpers bestimmten Proteinen, die vornehmlich in bestimmten Zelltypen oder Gewebekompartimenten vorkommen. Der Nachweis beruht auf einer Bindung zwischen Antikörpern (AK) und Epitopen des Antigens (AG). Bei der verwendeten immunhistochemischen Methode handelt es sich um eine Doppelmarkierung des zu detektierenden Antigens mittels eines Primär- und Sekundärantikörpers. Der unkonjugierte Primärantikörper bindet spezifisch an Epitope des Antigens und sollte

sich möglichst durch hohe Spezifität und Affinität auszeichnen. Der konjugierte Sekundärantikörper (der sekundäre Antikörper kann hierfür mit verschiedenen Substanzen, wie z.B. kleinen Molekülen, Enzymen oder Fluoreszenzfarbstoffen, gekoppelt sein) bindet an das Fc-Fragment (Fragment crystallizable) des Primärantikörpers. Durch chromogene Substratlösungen oder Enzymumsetzung können diese dann sichtbar gemacht und das gesuchte Antigen detektiert werden. Da jedes Antigen mehrere Epitope aufweist und somit mehrere Antikörper-Bindungsstellen hat, können schon geringe Mengen an Antigenen so verstärkt dargestellt werden.

3.2.5.2 Immunhistochemie mit DAB als Chromogen am Vollwandgewebe

Die markierte (labeled) Strept-Avidin-Biotin-Enzym-Komplex-Methode (LSAB-Methode) stellt aufgrund der hohen Sensitivität eine der gebräuchlichsten immunhistochemischen Methoden dar. Die Sensitivität beruht auf der hohen Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) und Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) zu Biotin. Beide Proteine besitzen vier Bindungsstellen für Biotinmoleküle.

Bei dieser Nachweismethode ist Biotin an den Sekundärantikörper gekoppelt (biotinyliert). Nach der Inkubation mit einem Avidin-Enzym-Konjugat bindet Avidin an Biotin. Das im Avidin-Enzym-Komplex enthaltene Enzym bildet nach Zugabe einer chromogenen Substratlösung ein farbiges Endprodukt und macht dadurch den Antikörper-Avidin-Biotin-Enzym-Komplex sichtbar.

Bei dem für diese Arbeit verwendeten Enzym handelte es sich um die Meerrettichperoxidase, die das Chromogen 3-3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem unlöslichen braunen Farbstoff umsetzt.

Die Konservierung eines Gewebes durch Fixantien wie Paraformaldehyd führt auch zu einem Verlust der Antigenität, was bedeutet, dass die Epitope nicht mehr von Antikörpern erkannt werden können. Daher sollte bei der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten zuvor eine Antigendemaskierung (*Antigen-Retrieval*) durchgeführt werden. Durch die Fixierung entstandene Quervernetzungen von Antigenen werden so wieder gelöst. Zur Antigendemaskierung können Enzyme, Mikrowellen oder Dampfhitze verwendet werden.

Zur Herstellung der LSAB-Färbungen wurden die Paraffinschnitte gemäß dem Protokoll aus Tabelle 15 prozessiert. Die gefärbten und fixierten Paraffinschnitte wurden lichtmikroskopisch (Nikon 6000) analysiert.

Tabelle 15: Arbeitsprotokoll der Immunhistochemie nach der ABC Methode und mit DAB als Chromogen an paraffineingebettetem Vollwandgewebe des Rattendarms

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
I	Xylol	>99,9 %	3 x 10 min	Deparaffinierung
II	absteigende Ethanolreihe	2x 100 %, 2x 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %	je 3 min	Wässern
III	H ₂ O _{seradest}		3 x je 5 min	Spülen
IV	H ₂ O ₂	3 %	10 min	Supprimierung der endogenen Peroxidase
V	H ₂ O _{seradest}		3 x je 5 min	Spülen
VIa	Citrat-Puffer	pH 6,1	2 x 5 min in der Mikrowelle	Permeabilisierung, AG Demaskierung
VIb			30 min bei RT	Abkühlung
VII	H ₂ O _{bidest}		3 x je 5 min	Spülen
VIII	TBS		3 x je 5 min	Spülen
IX	Primärantikörper	siehe Tabelle 16	über Nacht	Primärantikörper
X	TBS		3 x je 5 min	Spülen
XI	Sekundärantikörper	siehe Tabelle 16	45 min	Sekundärantikörper
XII	TBS		3 x je 5 min	Spülen

XIII	ABC-Elite Kit		45 min	Avidin-Biotin- Peroxidase Komplex
XIV	TBS		3 x je 5 min	Spülen
XV	Liquid DAB+		5 min	Chromogen, Visualisierung des AG-AK Komplexes
XVI	H ₂ O _{seradest}		3 x je 5 min	Spülen
XVII	aufsteigende Ethanolreihe	50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %	je 3 min	Dehydrierung
XVIII	Isomount			Fixierung

Nach Visualisierung durch das Chromogen wurde eine Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt.

Hierzu wurden die Schnitte ca. 20 Sekunden in unverdünntem Hämalaun inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit H₂O_{seradest} gespült und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Bläuung entsteht aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte von Leitungswasser und H₂O_{seradest} und dient der Zellkerndarstellung. Nach erneutem Spülen in H₂O_{seradest} erfolgte die Dehydrierung und Fixierung der Schnitte gemäß dem Standardprotokoll (siehe Tabelle 15).

Im Rahmen der abschließenden Fixierung mit Isomount wurde der auf dem Objektträger liegende Paraffinschnitt mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Tabelle 16: Antikörper, die in der Immunhistochemie von Rattenvollwandgewebe verwendet wurden

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Hersteller
primär			
Anti-CALD1	rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
sekundär			
Alpha E 0432	goat, anti-rabbit, biotyniliert	1:400	Dako, Hamburg, D

3.2.5.3 Immunzytochemie mit DAB als Chromogen an kultivierten enterischen Zellen

In den Kulturschalen erfolgte die Fixierung der enterischen Muskelzellen, der enterischen Nervenzellen oder der Kokulturen mittels 4 %iger Paraformaldehydlösung für 30 min. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit TBS gespült und dann für 10 min in 99,9 % igem, 4°C kaltem Methanol permeabilisiert. Daraufhin folgte eine erneute dreimalige Spülung mit TBS. Für die weitere Aufbereitung, wie in Tabelle 17 aufgeführt, wurden die Deckgläser aus den Kulturschalen entfernt. Die fixierten, kultivierten Zellen wurden entsprechend Tabelle 17 prozessiert und daraufhin lichtmikroskopisch (Nikon 6000) analysiert.

Tabelle 17: Arbeitsprotokoll der Immunhistochemie nach der LSAB-Methode und mit DAB als Chromogen an kultivierten enterischen Rattenmuskelzellen

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
I	normal goat Serum	1:10	30 min	Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung
II	Primärantikörper	siehe Tabelle 18	1 h	Primärantikörper zur Bildung eines AG-AK Komplexes
III	TBS		3 x	Spülen
IV	Sekundärantikörper	siehe Tabelle 18	30 min	Sekundärantikörper zur Bindung an Primärantikörper
V	TBS		3 x	Spülen
VI	ABC-Elite Kit		30 min	Avidin-Biotin Peroxidase Komplex
VII	TBS		3 x	Spülen
VIII	Liquid DAB+		5 min	Chromogen zur Visualisierung des AG-AK Komplexes
IX	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
X	Aquatex			Eindeckung

Tabelle 18: Antikörper, die in der Immunhistochemie der Zellkulturen verwendet wurden

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Hersteller
primär			
Anti-CALD1	rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Anti-Tubulin βIII	mouse	1:1000	Millipore, Temecula, CA
sekundär			
Alpha E 0432	goat, anti-rabbit biotyniliert	1:400	Dako, Hamburg, D

3.2.5.4 Fluoreszenz-Immunzytochemie an kultivierten enterischen Muskelzellen

Zur Herstellung der Fluoreszenz-Färbungen wurden die fixierten, kultivierten enterischen Muskelzellen entsprechend Tabelle 19 prozessiert, wobei die Inkubation mit dem Sekundärantikörper und alle folgenden Schritte zum Erhalt der Fluoreszenz im Dunkeln erfolgten.

Zur Lokalisationsbestimmung wurde eine Doppelfärbung von Caldesmon (CALD1) und α -smooth muscle actin (α -SMA) durchgeführt. Die fluoreszenz-gefärbten und fixierten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch (Axiovert 200 M, Zeiss) analysiert.

Tabelle 19: Arbeitsprotokoll der Fluoreszenz-Immunzytochemie an kultivierten enterischen Rattenmuskelzellen

Schritt	Substanz	Konzentration	Dauer	Zweck
I	normal goat Serum	1:10	30 min	Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung
II	TBS		3 x	Spülen
III	Primärantikörper	siehe Tabelle 20	1h	Primärantikörper zur Bildung eines AG-AK Komplexes
IV	TBS		3 x	Spülen
V	Sekundärantikörper	siehe Tabelle 20	30 min	Sekundärantikörper zur Bindung an Primärantikörper
VI	TBS		3 x	Spülen
VII	DAPI		30 min	Kern-Gegenfärbung
VIII	TBS		3 x	Spülen
IX	H ₂ O _{seradest}		3 x	Spülen
X	Immumount			Eindecken und Erhalt der Fluoreszenz

Tabelle 20: Antikörper, die in der Fluoreszenz-Immunzytochemie der enterischen Muskelzellen verwendet wurden

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Hersteller
primär			
Anti-CALD1	rabbit	1:500	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Anti- α -SMA	mouse	1:100	Dako, Hamburg, D
sekundär			
Alexa Fluor 546	goat, anti-mouse	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor 488	goat, anti-rabbit	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung, der aus den ontogenetischen Genexpressionstudien erhaltenen Daten, wurde unter Verwendung einer one-way-ANOVA, gefolgt von einem Newman-Keuls post hoc Test, mit Hilfe des Statistikprogrammes GraphPad prism 4.0 durchgeführt. Die Daten der Genexpressionstudien der enterischen Muskelzellkulturen wurden mittels eines Mann-Whitney-U-Tests, nachdem eine Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests ausgeschlossen wurde, statistisch ausgewertet. Die graphische Darstellung erfolgte als Mittelwert \pm SEM in Form von Balkendiagrammen. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ war.

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung der enterischen Muskulatur im Rattendarm

Um die ontogenetische Entwicklung der Tunica muscularis im Dün- und Dickdarm der Ratte nachzuvollziehen, wurde die glatte Muskulatur des Darms adulter Ratten mit konventionellen histologischen Färbungen (Azanfärbung, HE-Färbung) sowie immunhistologisch mit Antikörpern gegen den glattmuskulären Marker Caldesmon untersucht. Als Grundlage hierfür dienten Rattendärme der Wistar Ratte in den Entwicklungsstadien P2 und P21 sowie adulter Ratten (>3 Monate). Um die quantitative Veränderung der glatten Muskulatur der verschiedenen Entwicklungsstadien deskriptiv darzustellen, wurde die Anzahl der Zellschichten in den einzelnen Muskelschichten (Stratum circulare, Stratum longitudinale, Lamina muscularis mucosae) ermittelt, indem die Muskelschichtdicke ausgemessen und durch den durchschnittlichen Zelldurchmesser (5 µm) (Lüllmann-Rauch) dividiert wurde. Immunhistochemisch wurde die Verteilung des glattmuskulären Markers Caldesmon mittels einer LSAB-Immunhistochemie mit DAB und Hämalun als Gegenfärbung dargestellt.

In jedem Entwicklungsstadium war, unabhängig von der Färbetechnik, eine Unterscheidung von Mukosa, Submukosa und Muskularis möglich.

Im Entwicklungsstadium P2 (Abb. 4+5) stellte sich sowohl im Dünndarm (Abb. 4) als auch im Dickdarm (Abb. 5) eine deutliche Muskularis dar. Innerhalb dieser konnte aufgrund der vertikalen Zellausrichtung – und der damit verbundenen dunkleren Färbung – die Längsmuskulatur von der Ringmuskulatur unterschieden werden. Im Dün- und Dickdarm wies die Ring- und Längsmuskulatur 4-5 Zellschichten auf (Abb. 4 B, 5 B). Im Vergleich zur Muskularis ließ sich die Submukosa anhand größerer Blutgefäße und der weniger dichten Struktur einordnen (Abb. 4 A+C, 5 A+C). Eine Abgrenzung der Lamina muscularis mucosae war in diesem Entwicklungsstadium nicht möglich. Auch das Bindegewebe, welches sich in der Azanfärbung blau darstellt, war zu diesem Zeitpunkt nur geringgradig vorhanden (Abb. 4 C, 5 C). Dagegen konnte der glattmuskuläre Marker Caldesmon deutlich in der gesamten Muskularis sowie geringgradig in Anteilen der Submukosa und Mukosa nachgewiesen werden (Abb. 4 D, 5 D).

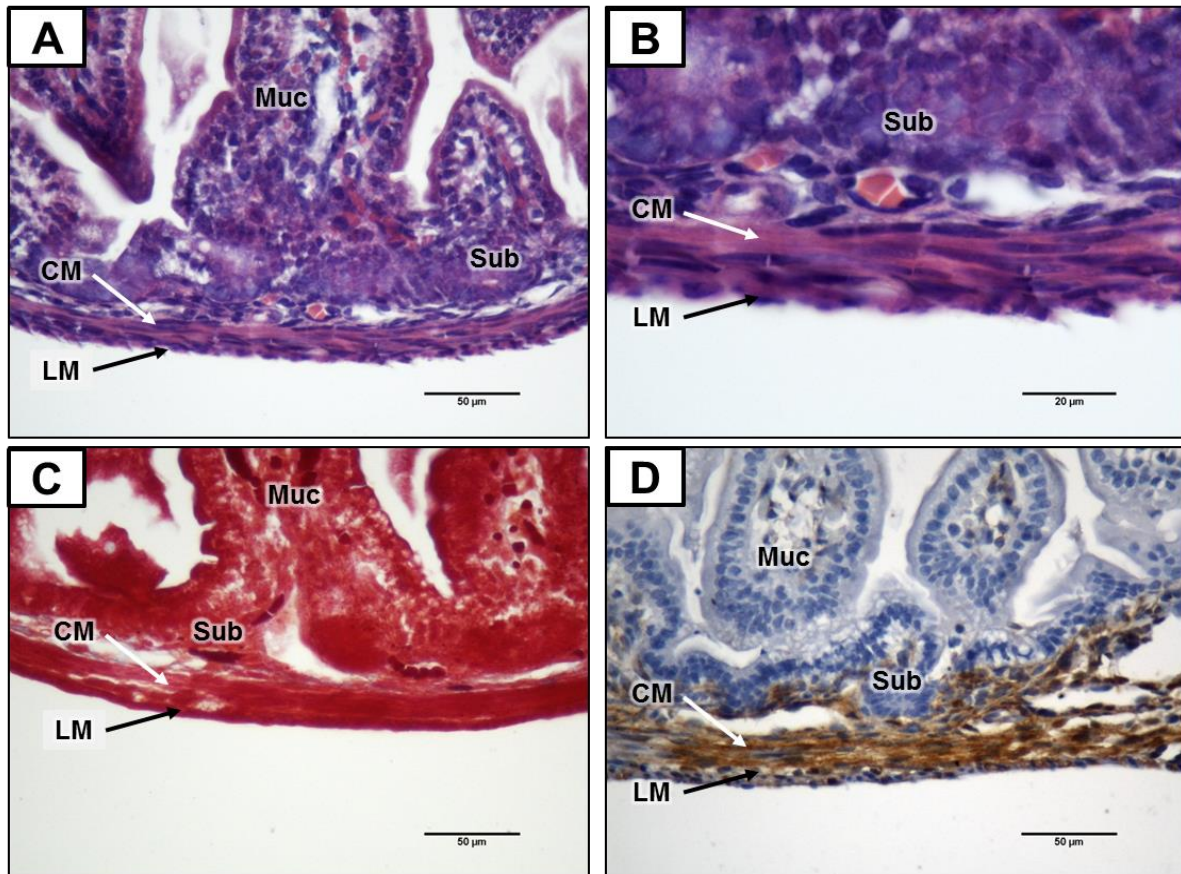


Abb. 4: Enterische Muskulatur im Dünndarm der Ratte, Entwicklungsstadium P2.

(A+B) HE-Färbung, (C) Azan-Färbung, (D) Visualisierung der Caldesmon-Immunreaktivität mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalun. (A) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (B) Detail Ring- und Längsmuskulatur, Submukosa; (C) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (D) Übersicht Caldesmon-Immunreaktivität der Ring- und Längsmuskulatur.

Mukosa (Muc), Submukosa (Sub), Ringmuskulatur (CM), Längsmuskulatur (LM). Maßstabsbalken: 50 µm (A+C+D), 20 µm (B).

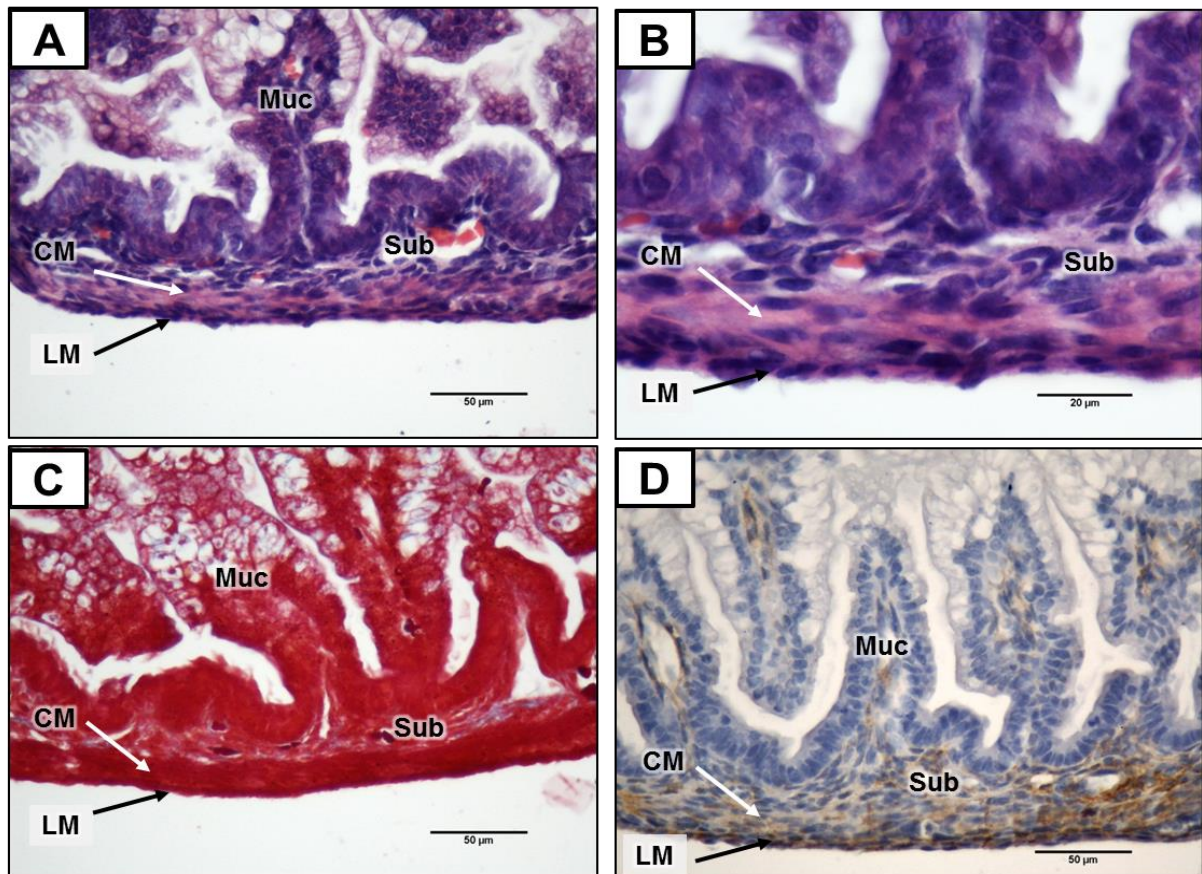


Abb. 5: Enterische Muskulatur im Kolon der Ratte, Entwicklungsstadium P2.

(A+B) HE-Färbung, (C) Azan-Färbung, (D) Visualisierung der Caldesmon-Immunreaktivität mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalun. (A) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (B) Detail Ring- und Längsmuskulatur, Submukosa; (C) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (D) Übersicht Caldesmon-Immunreaktivität der Ring- und Längsmuskulatur.

Mukosa (Muc), Submukosa (Sub), Ringmuskulatur (CM), Längsmuskulatur (LM).

Maßstabsbalken: 50 µm (A+C+D), 20 µm (B).

Im Entwicklungsstadium P21 war neben der Mukosa, Submukosa und Muskularis auch eine Lamina muscularis mucosae erkennbar (Abb. 6 + 7). Im Dünn- und Dickdarm wies die Ringmuskulatur 5-10, die Längsmuskulatur 3-4 und die Lamina muscularis mucosae 2-4 Zellschichten auf (Abb. 6 B, 7 B). In der Azanfärbung war ein deutlich höherer Bindegewebsgehalt erkennbar (Abb. 6 C, 7 C). Caldesmon konnte auch in der Lamina muscularis mucosae nachgewiesen werden (Abb. 6 D, 7 D).

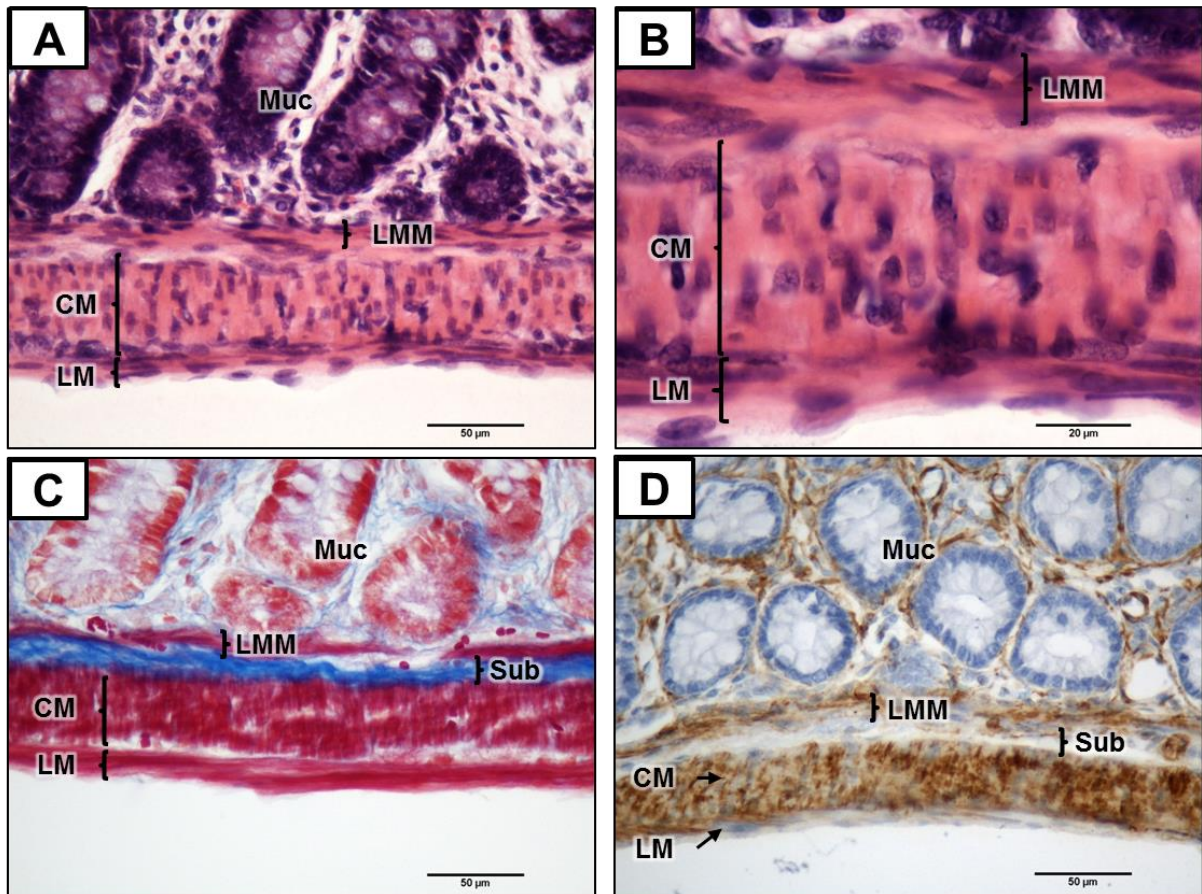


Abb. 6: Enterische Muskulatur im Dünndarm der Ratte, Entwicklungsstadium P21.

(A+B) HE-Färbung, (C) Azan-Färbung, (D) Visualisierung der Caldesmon-Immunreaktivität mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalaun. (A) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (B) Detail Ring- und Längsmuskulatur, Submukosa; (C) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (D) Übersicht Caldesmon-Immunreaktivität der Ring- und Längsmuskulatur.

Mukosa (Muc), Submukosa (Sub), Lamina muscularis mucosae (LMM), Ringmuskulatur (CM), Längsmuskulatur (LM). Maßstabsbalken: 50 µm (A+C+D), 20 µm (B).

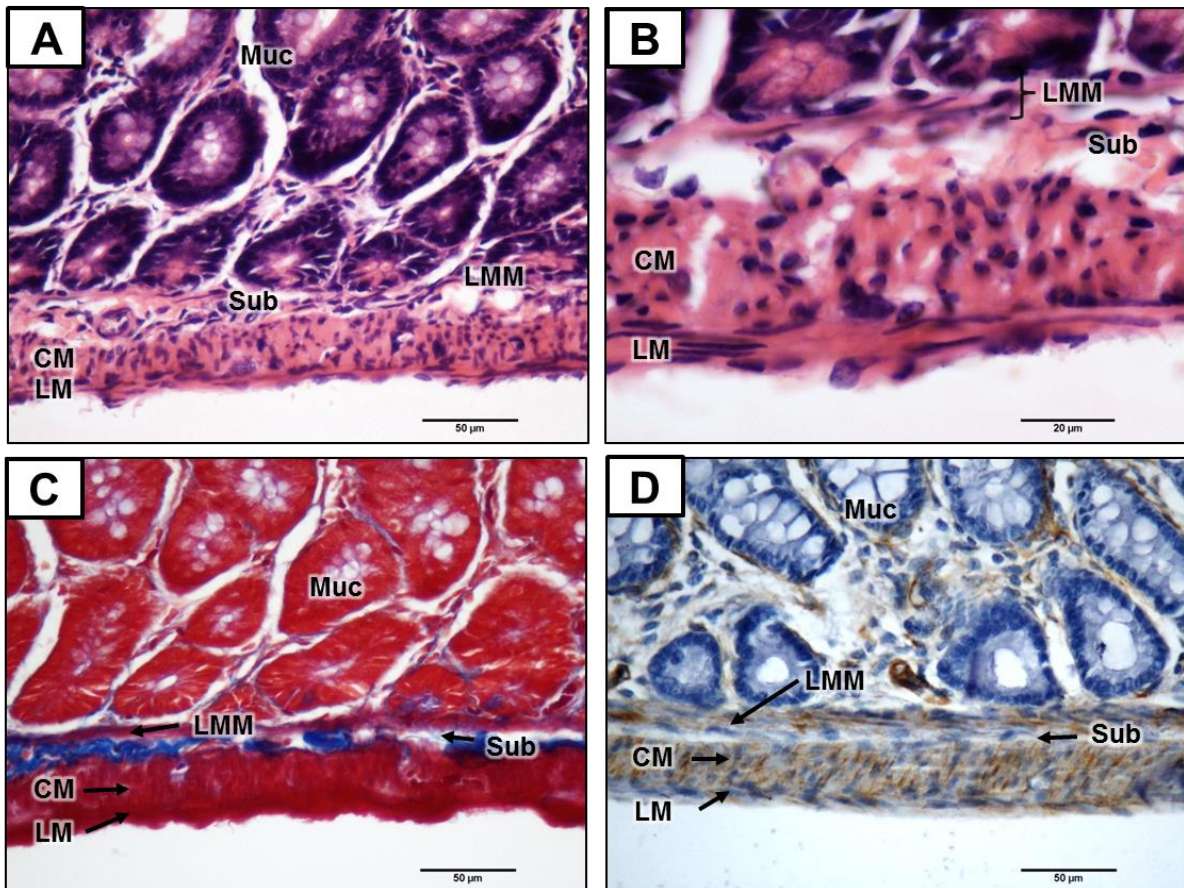


Abb. 7: Enterische Muskulatur im Kolon der Ratte, Entwicklungsstadium P21.

(A+B) HE-Färbung, (C) Azan-Färbung, (D) Visualisierung der Caldesmon-Immunreaktivität mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalun. (A) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (B) Detail Ring- und Längsmuskulatur, Submukosa; (C) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (D) Übersicht Caldesmon-Immunreaktivität der Ring- und Längsmuskulatur. Mukosa (Muc), Submukosa (Sub), Lamina muscularis mucosae (LMM), Ringmuskulatur (CM), Längsmuskulatur (LM). Maßstabsbalken: 50 µm (A+C+D), 20 µm (B).

In adulten Ratten zeigte sich ein deutlicher Plexus myentericus (Abb. 8 A, C). Im Dünndarm bestand die Ringmuskulatur aus 5-20, die Längsmuskulatur aus 3-10 und die Lamina muscularis mucosae aus 2-3 Zellschichten (Abb. 8 B). Die Ring- und Längsmuskulatur des Dickdarms zeigte eine Zellschichtanzahl zwischen jeweils 4-6. Die Lamina muscularis mucosae wies 2-3 Zellschichten auf (Abb. 8 B). In der Azanfärbung zeigte sich eine Zunahme des Bindegewebsanteils in der Submukosa (Abb. 8 C, 9 C).

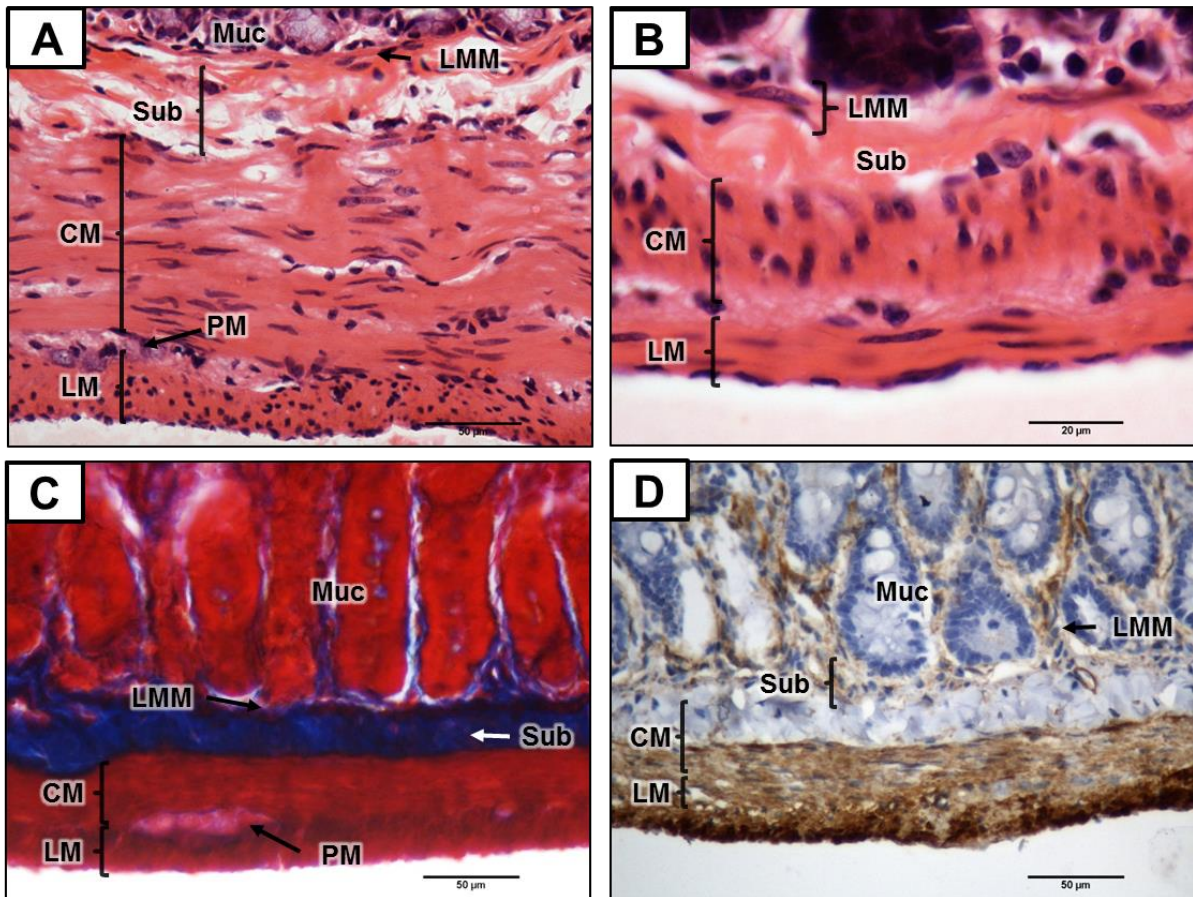


Abb. 8: Enterische Muskulatur im Dünndarm der adulten Ratte.

(A+B) HE-Färbung, (C) Azan-Färbung, (D) Visualisierung der Caldesmon-Immunreaktivität mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalun. (A) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (B) Detail Ring- und Längsmuskulatur, Submukosa; (C) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (D) Übersicht Caldesmon-Immunreaktivität der Ring- und Längsmuskulatur.

Mukosa (Muc), Submukosa (Sub), Lamina muscularis mucosae (LMM), Plexus myentericus (PM), Ringmuskulatur (CM), Längsmuskulatur (LM). Maßstabsbalken: 50 µm (A+C+D), 20 µm (B).

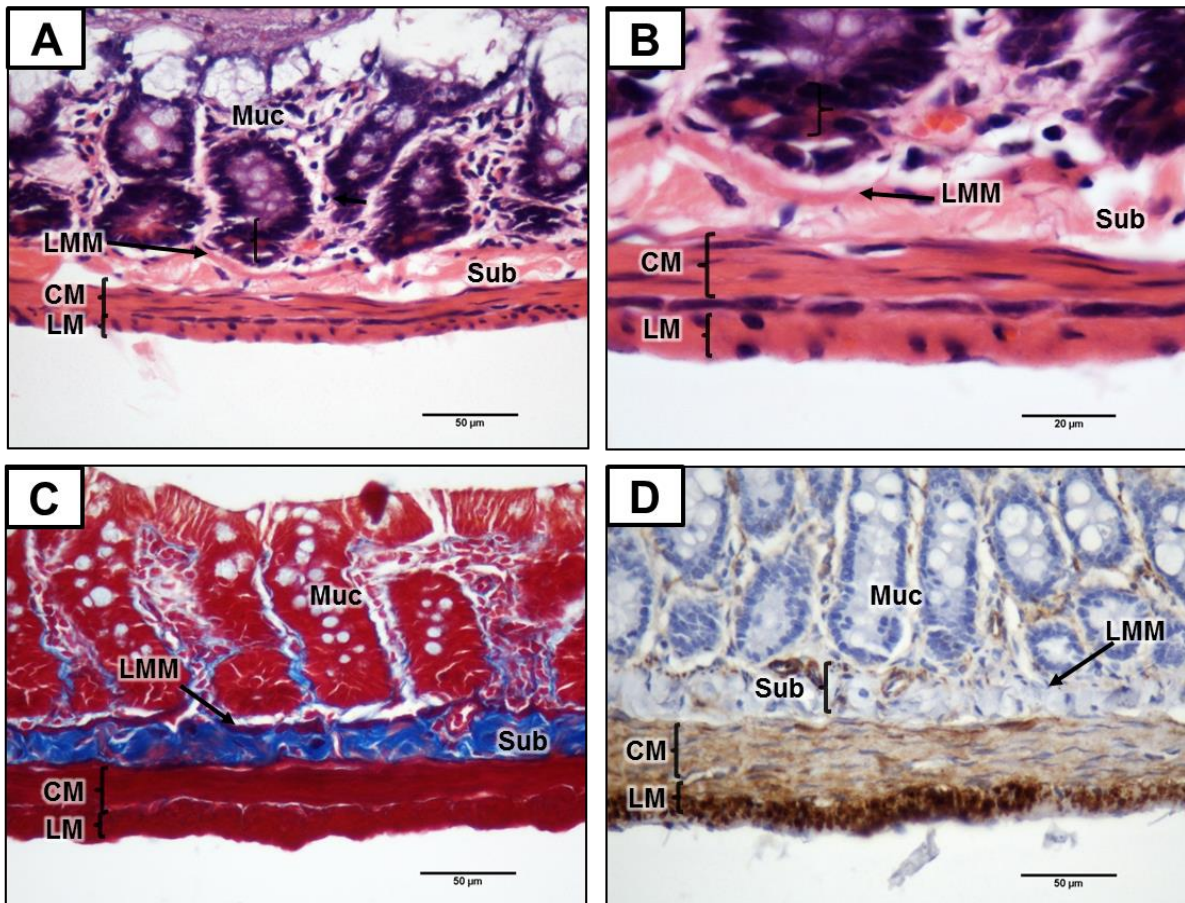


Abb. 9: Enterische Muskulatur im Kolon der adulten Ratte.

(A+B) HE-Färbung, (C) Azan-Färbung, (D) Visualisierung der Caldesmon-Immunreaktivität mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalun. (A) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (B) Detail Ring- und Längsmuskulatur, Submukosa; (C) Übersicht Mukosa, Submukosa und Muskularis; (D) Übersicht Caldesmon-Immunreaktivität der Ring- und Längsmuskulatur.

Mukosa (Muc), Submukosa (Sub), Lamina muscularis mucosae (LMM), Ringmuskulatur (CM), Längsmuskulatur (LM). Maßstabsbalken: 50 µm (A+C+D), 20 µm (B).

4.2 Ontogenetische mRNA Expression des GDNF Systems im Rattendarm

Um die Komponenten des GDNF Systems während der Ontogenese der Ratte darzustellen, wurden mRNA Expressionsprofile des Dünn- (Abb. 10 A, C, E) und Dickdarms (Abb. 10 B, D, F) der Ratte im postnatalen Alter P0, 3, 6, 21 sowie adulter Ratten bestimmt. Zu allen Zeiten konnte eine mRNA Expression von GDNF und dessen korrespondierenden Rezeptoren nachgewiesen werden. Im Dünndarm zeigte sich ein Peak der GDNF mRNA Expression bei P 6 mit anschließender Abnahme mit zunehmendem Alter (Abb. 10 A). Im Dickdarm war die GDNF Expression bei P3 und P6 am höchsten, obwohl die Unterschiede im Vergleich mit anderen Zeitpunkten nicht signifikant waren (Abb. 10 B). Im frühen postnatalen Alter war das GDNF Level im Dünndarm zweifach höher als die ermittelten Werte im gleichen Alter im Dickdarm, wohingegen die Expressionslevel bei P21 und adulten Tieren ähnlich waren (Abb. 10 A, B). Annähernd gleiche Expressionsprofile wurden auch für die mRNA Expression von GFR α 1 im Dünndarm ermittelt (Abb. 10 C). Das höchste Level wurde bei P6, ähnlich der GDNF Expression, ermittelt (Abb. 10 C). Im Dickdarm zeigte die GFR α 1 mRNA Expression bei P3 (Abb. 10 D) ihren Peak, ähnlich der ermittelten Werte im Dünndarm. Die GFR α 1 Werte im Dünndarm waren bei Geburt und P6 höher als jeweilige Werte im Dickdarm. RET zeigte im frühen postnatalen Alter erhöhte Werte, die aber im Zuge der weiteren Ontogenese abnahmen (Abb. 10 E). Die RET mRNA Expression im Dickdarm nahm mit zunehmendem postnatalem Alter ebenfalls ab, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersstufen feststellbar waren (Abb. 10 F). Die RET mRNA Expression im Dünndarm war vergleichbar mit der RET mRNA Expression im Dickdarm.

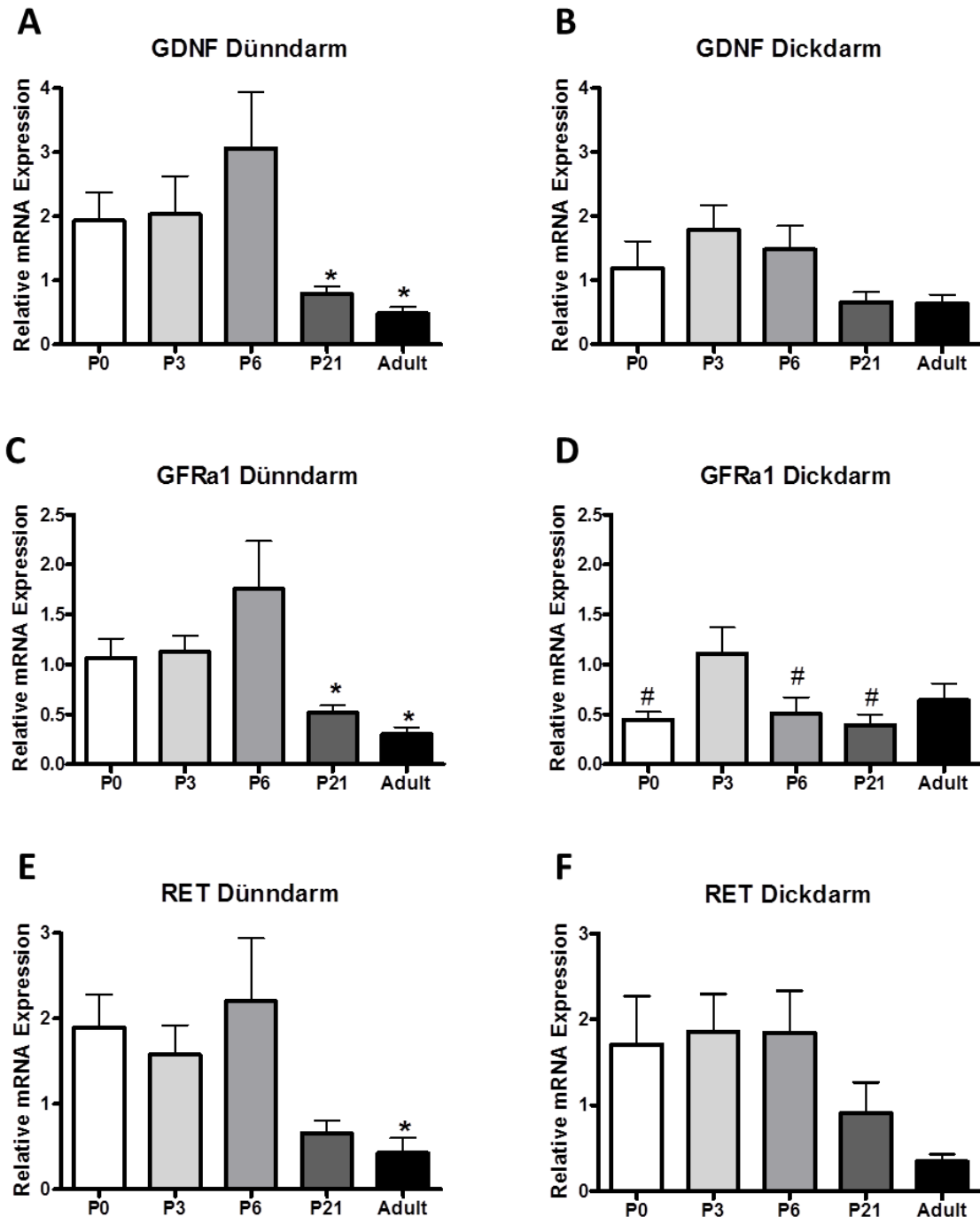


Abb. 10: Ontogenetische mRNA Expression des GDNF-Systems im Rattendarm.

(A), (C), (E) mRNA Expression des GDNF-Systems der Entwicklungsstadien P0, P3, P6, P21, Adult im Dünndarm; (B), (D), (F) mRNA Expression des GDNF-Systems der Entwicklungsstadien P0, P3, P6, P21, Adult im Dickdarm; (A) und (B) mRNA Expression von GDNF; (C) und (D) mRNA Expression von GFRα1; (E) und (F) mRNA Expression von RET. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM aufgetragen, $n=7-8$ pro Versuchsgruppe, # $p<0,05$ vs. P3, * $p<0,05$ vs. P6; Postnataler Tag (P).

4.3 Lokalisation von Caldesmon in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen

Um in den kultivierten glatten Muskelzellen kontraktile Elemente nachzuweisen, wurden immunzytochemische Markierungen gegen Caldesmon sowie eine Dual label-Fluoreszenzimmunzytochemie gegen Caldesmon und α -SMA durchgeführt. Bei der Visualisierung des glattemuskulären Markers Caldesmon mittels LSAB-Immunzytochemie zeigte sich eine deutliche Immunreaktivität in den längs orientierten myofilamentären Strukturen der glatten Muskelzellen (Abb. 11 A).

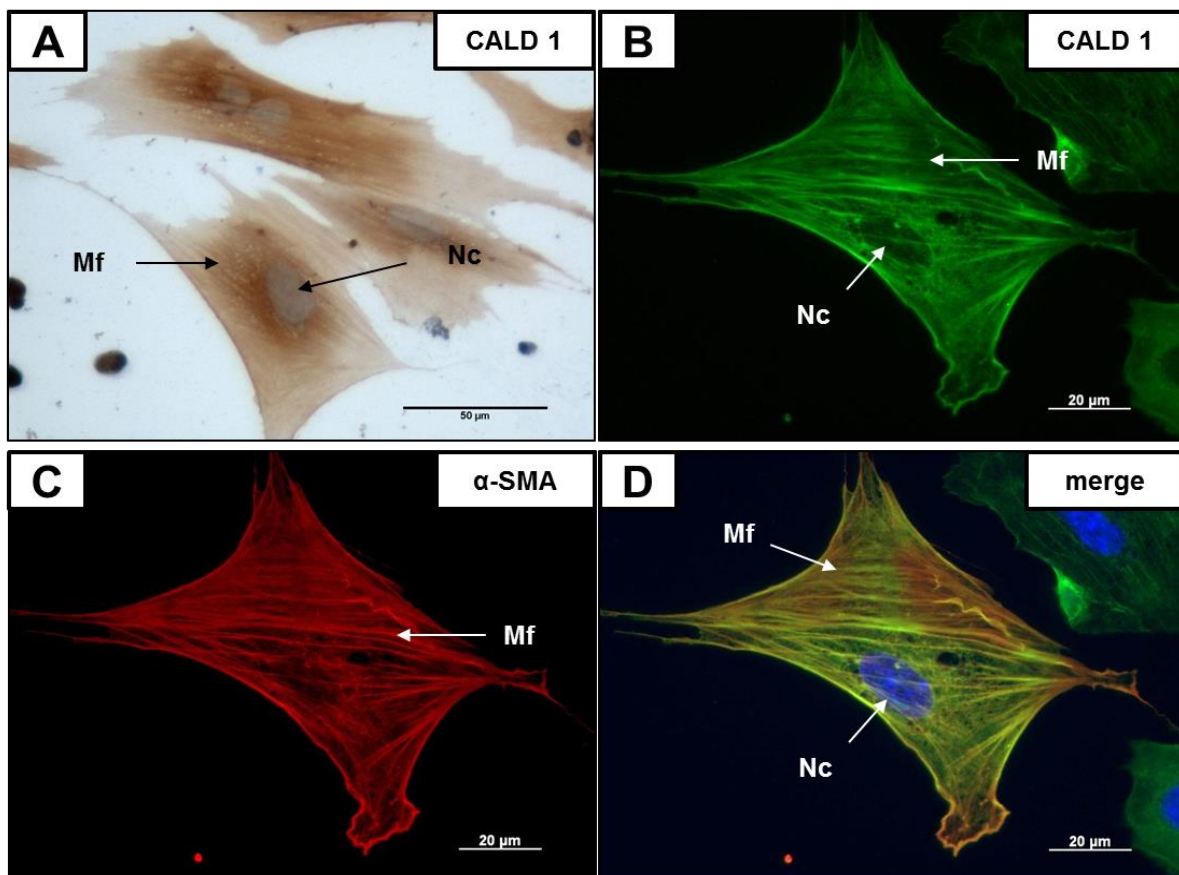


Abb. 11: Lokalisation von Caldesmon in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen.

(A) LSAB-Immunzytochemie in kultivierten glatten Muskelzellen, (B), (C) und (D) Dual-Label Fluoreszenz-Immunzytochemie in kultivierten glatten Muskelzellen. (A) Enterische Muskelzelle, anti-CALD1 LSAB-Immunzytochemie (braun); (B) enterische Muskelzelle, anti-CALD1 Fluoreszenz-Immunzytochemie (grün); (C) enterische Muskelzelle, anti- α -SMA Fluoreszenz-Immunzytochemie (rot); (D) enterische Muskelzelle, Fluoreszenz-Immunzytochemie Triplemarkierung (merge) anti-CALD1, anti- α -SMA, DAPI-Zellkernmarkierung (blau). Caldesmon (CALD1), alpha smooth muscle actin (α -SMA), 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Myofilamente (Mf), Zellkern (Nc). Maßstabsbalken: 50 μ m (A), 20 μ m (B+C+D).

Bei der Fluoreszenz-immunzytochemischen Doppelmarkierung für die glattmuskulären Marker Caldesmon und α -SMA zeigte sich ebenfalls eine starke Immunreaktivität für Caldesmon in den Muskelzellen (Abb. 11 B). Die Verteilung von Caldesmon (grün) entsprach dabei annähernd der Anordnung der glattmuskulären Aktinfilamente (rot) in Abb. 11 C. Durch die DAPI-Kernmarkierung (blau) kam es zur deutlichen Aufzeigung des Zellkerns (Abb. 11 D). In der überlagerten, sogenannten „merge“ Darstellung der drei Marker zeigten die intrazellulären Strukturen eine gelbliche Färbung (Abb. 11 D).

4.4 mRNA Expression des GDNF-Systems in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen

Um den Hinweis zu erbringen, dass auch kultivierte Muskelzellen in der Lage sind, den neurotrophen Faktor GDNF zu exprimieren, wurden mRNA Expressionsprofile nach 7tägiger (Abb. 12 A, C, E) und 14tägiger Kultivierungsdauer (Abb. 12 B, D, F) mit serumfreiem Neurobasalmedium + B27 sowie serumhaltigem Vollmedium in enterischen glatten Muskelzellen der Ratte bestimmt. Sowohl nach 7tägiger als auch nach 14tägiger Kultivierungsdauer konnte in beiden Medien eine mRNA Expression des GDNF und seiner korrespondierenden Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Expression von GDNF war sowohl nach 7tägiger als auch nach 14tägiger Kultivierung im serumhaltigen Vollmedium höher als im serumfreien Medium, obwohl die Unterschiede nicht signifikant waren (Abb. 12 A + B). Annähernd gleiche Expressionsprofile wurden auch für die mRNA Expression von GFR α 1 ermittelt (Abb. 12 C + D). Auch hier war die Expression im serumhaltigen Vollmedium höher als im serumfreien Medium, obwohl auch hier die Unterschiede nicht signifikant waren. Die RET mRNA Expression nach 7 und 14tägiger Kultivierung zeigte hingegen eine signifikante Erhöhung im serumhaltigen im Gegensatz zum serumfreien Medium (Abb. 12 E + F).

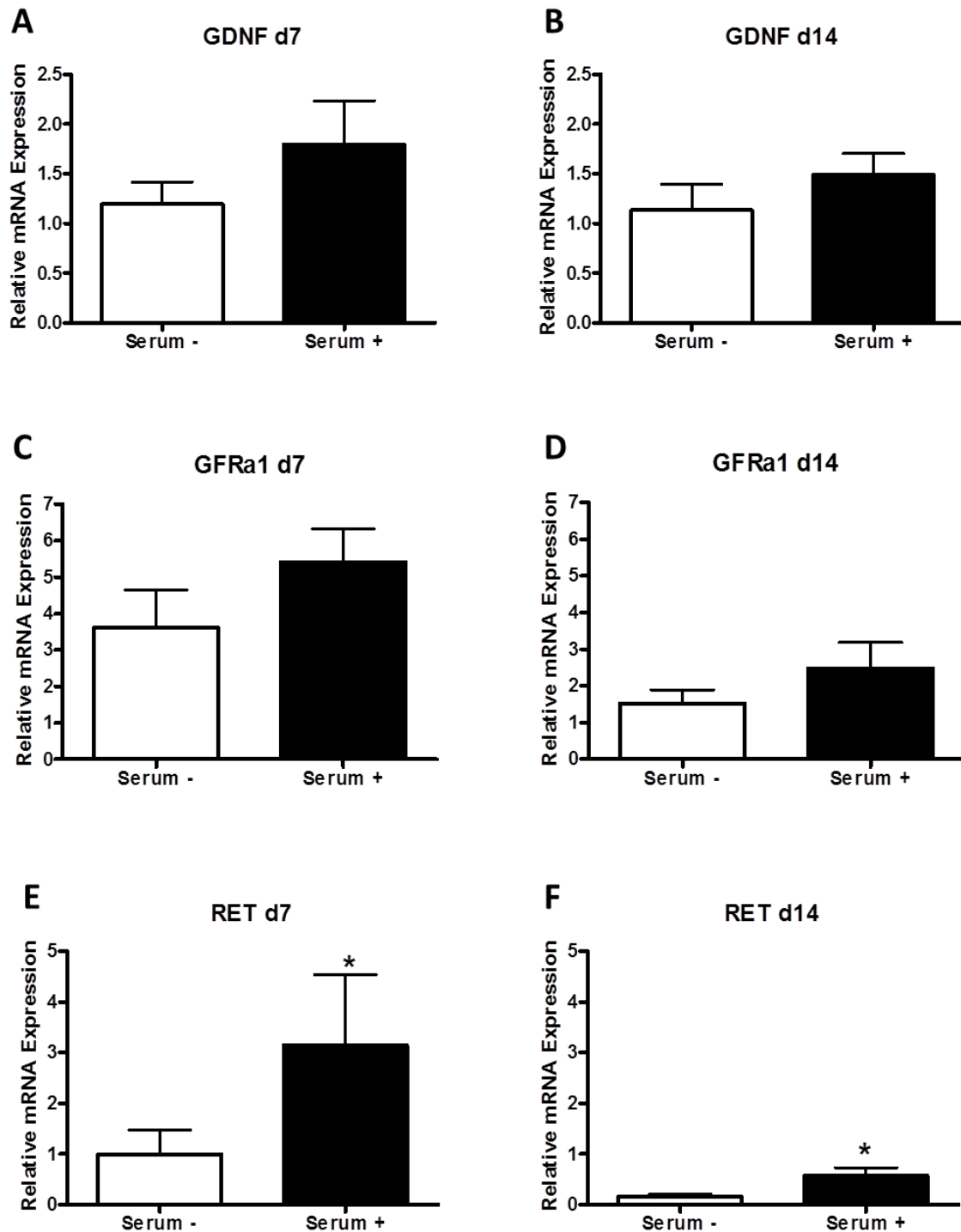


Abb. 12: mRNA Expression des GDNF-Systems in kultivierten enterischen glatten Muskelzellen.

(A), (C), (E) mRNA Expression des GDNF-Systems nach 7tägiger Kultivierung; (B), (D), (F) mRNA Expression des GDNF-Systems nach 14tägiger Kultivierung; (A) und (B) mRNA Expression von GDNF; (C) und (D) mRNA Expression von GFRα1; (E) und (F) mRNA Expression von RET. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM aufgetragen, n=7-8 pro Versuchsgruppe, *p<0,05; Neurobasalmedium + B27 (Serum -), Vollmedium (Serum +).

4.5 Charakterisierung enterischer Neurone in Kokulturen

Um die Bedeutung der Muskelzellen als Quelle des GDNFs und dessen Einfluss auf die Differenzierung enterischer Neurone weiter zu charakterisieren, wurden isolierte enterische Neurone auf einem Feeder-Layer von Muskelzellen kultiviert und anschließend das Mikrotubuli-Protein β III-Tubulin immunzytochemisch mittels einer LSAB-Immunhistochemie mit DAB und Hämalaun als Gegenfärbung dargestellt. Während die enterischen Nervenzellen ohne GDNF-Substitution nach einwöchiger Kulturdauer weder proliferierten noch differenzierten (Abb. 13 A), war unter GDNF-Behandlung eine starke Proliferation der Zellen, die sich in vergrößerten Ganglien manifestierte, nachweisbar. (Abb. 13 B). Daneben bildeten diese Zellkulturen sehr viele neuronale Fortsätze aus, die sich zu einem neuronalen Netzwerk formierten. Nach Kultivierung enterischer Neurone auf einem Feederlayer glatter Muskelzellen war eine ähnliche Netzwerkbildung ohne Substitution von exogenem GDNF nachweisbar (Abb. 13 C).

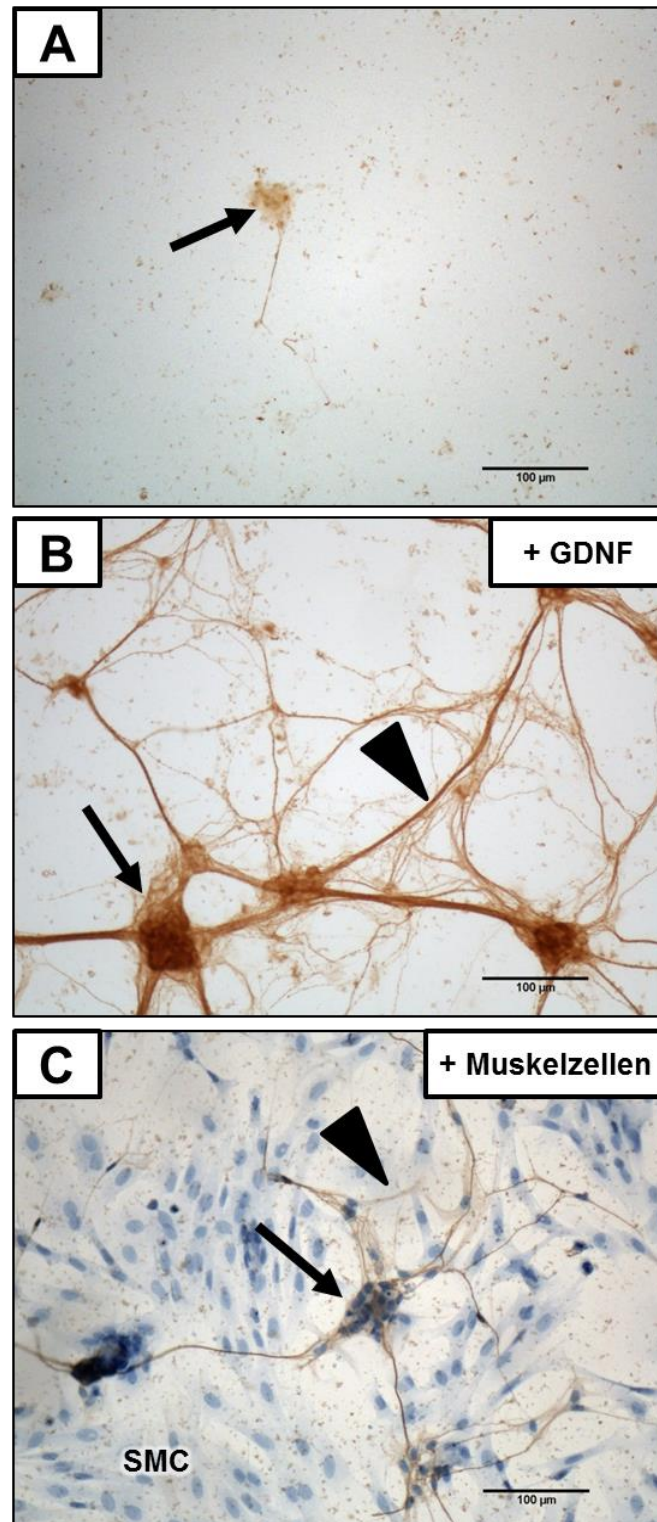


Abb. 13: Netzwerkbildung enterischer Neurone in Kokulturen.

Visualisierung der Tubulin- β III-Immunreaktivität mit DAB und Gegenfärbung mit Hämalaun.

(A) Zellkultur enterischer Neurone, (B) Zellkultur enterischer Neurone unter Zugabe von 50 ng/ μ l GDNF, (C) Kokultur enterischer Neurone mit enterischen glatten Muskelzellen. Neuronale Somata sind mit Pfeilen, Dendritennetzwerke mit Pfeilspitzen markiert. Glatte Muskelzellen (SMC). Maßstabsbalken: 100 μ m (A+B+C).

5 Diskussion

5.1 Grundlegende Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit führte zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Die Ontogenesestudie der Muskulatur des Rattendarms zeigte im Stadium P2 keine deutlich entwickelte Lamina muscularis mucosae, während sie sich im Stadium P21 deutlich darstellen ließ. Der glattmuskuläre Marker Caldesmon war in der gesamten Tunica muscularis in allen untersuchten Altersstufen besonders deutlich im Stadium P2 auffindbar. Im adulten Rattendarm fiel ein ausgeprägter Plexus myentericus und die Zunahme des Bindegewebsanteils in der Submukosa auf.
- 2) In allen Altersstufen (P0, P3, P6, P21, Adult) war eine mRNA-Expression von GDNF und dessen korrespondierenden Rezeptoren GFR α 1 und RET nachweisbar. Im Dünndarm zeigte sich ein mRNA-Expressionspeak von GDNF im Stadium P6, im Dickdarm bei P3 sowie P6. Im frühen postnatalen Alter waren höhere mRNA-Expressionswerte von GDNF im Dünndarm als im Dickdarm erkennbar, wohingegen sich die mRNA-Expressionslevel in den Stadien P21 und Adult in den verschiedenen Darmabschnitten ähnelten. Die korrespondierenden Rezeptoren von GDNF zeigten, im Vergleich mit GDNF, einen annähernd ähnlichen Verlauf ihres Expressionslevels.
- 3) Kultivierte glatte Muskelzellen aus dem Dünndarm behielten weitgehend ihren Phänotyp und zeigten eine Expression von Komponenten des kontraktilen Apparates in Form von Myofilamenten.
- 4) Kultivierte glatte Muskelzellen exprimierten in unterschiedlichen Medien mRNA von GDNF und dessen korrespondierenden Rezeptoren.
- 5) Enterische Neurone differenzierten sich unter GDNF-Zugabe deutlich. Dieser Effekt konnte auch bei der Kultivierung enterischer Neurone auf einem Feederlayer glatter Muskelzellen ohne Substitution von GDNF beobachtet werden.

5.2 Ontogenese der Muskulatur im Rattendarm

Im Zuge der Entwicklung einer Zellkultur aus intestinalen glatten Muskelzellen wurde eine Ontogenesestudie der Muskulatur am Rattendarm durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es, einen Überblick über die Ausprägung der glatten Muskulatur in verschiedenen postnatalen Stadien zu erhalten. Die Ergebnisse zeigten eine in allen untersuchten Stadien (P2, P21, Adult) vorhandene Tunica muscularis. Die Lamina muscularis mucosae war erst ab dem Stadium P21 deutlich erkennbar. Der glattemuskuläre Marker Caldesmon konnte in der gesamten Tunica muscularis aller Altersstufen, besonders ausgeprägt in P2, nachgewiesen werden. Im adulten Stadium kam es zudem zu einem Anstieg des Bindegewebes und zu einer deutlicheren Ausprägung des Plexus myentericus. Übereinstimmend mit einer Studie von Penkova (Penkova et al., 2010) zeigt diese Arbeit, dass die Darmentwicklung, speziell die der glatten Muskulatur, noch nicht unmittelbar postnatal abgeschlossen ist. Mit zunehmendem Alter kam es zu einem Anstieg der Anzahl der Muskelzelllagen, insbesondere in der Ringmuskulatur. Ferner zeigten sich geringgradige Unterschiede zwischen Dünn- und Dickdarm, wobei die Dünndarmabschnitte eine höhere Anzahl an Zelllagen aufwiesen. Dies stimmt mit einer Studie von Vollrath überein, in der dieser das Jejunum zum Zeitpunkt der Geburt als noch nicht enddifferenziert beschreibt (Vollrath, 1969). Zudem konnte er eine starke Zunahme der Muskelzellzahl im Darmtrakt ab dem 16.-17. Embryonaltag nachweisen. Die Lamina muscularis mucosae bildete sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Ring- und Längsmuskulatur recht spät aus. Vollrath datiert die Ausbildung im Rattendarm auf den 9.-11. Lebenstag (Vollrath, 1969). Keding et al. zeigten 1990 eine immunhistochemische Färbung von α -SMA am 10. postnatalen Tag (P10) (Keding et al., 1990). Die Muskelzellen im Stadium P2/P3 zeigten sich geeignet, um weitere Studien in Form von Muskelzellkulturen durchzuführen. Die Zellen proliferierten noch und zeigten einen hohen Grad an kontraktilen Elementen und geringem Bindegewebsanteil. Somit sprach alles für das Vorliegen von kontraktilen Muskelzelltypen, die für die nachfolgenden Studien benötigt wurden.

5.3 mRNA Expression des GDNF-Systems

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten in allen postnatalen Altersstufen eine mRNA-Expression von GDNF und dessen korrespondierenden Rezeptoren GFR α 1 und RET. Laut einer Studie von Rothman et al. aus dem Jahr 1986 ließ sich eine mRNA Expression von GDNF im Maudarm bereits am Embryonaltag 17 (E17) dedektieren (Rothman et al., 1986). RET war in enterischen Neuroblasten am Tag E9-E11,5 nachweisbar (Pachnis et al., 1993). Im Zuge der Embryogenese kommt es zur Auswanderung von Neural crest cells (NCC) aus der Neuralleiste in den Gastrointestinaltrakt (Yntema und Hammond, 1954). Diese Besiedelung zeigt eine wellenförmige rostrokaudale Richtung, beginnend mit dem Magen im Stadium E9,5-10, bis zur kompletten Besiedlung des Darms im Stadium E14 der Maus (Young et al., 1998). Eine ähnliche Besiedelung konnte auch im Humandarm in der 4.-7. Woche gezeigt werden (Wallace und Burns, 2005). GDNF spielt in dieser Phase eine entscheidende Rolle als chemoattraktive Substanz für vagale NCC (Young et al., 2001; Natarajan et al., 2002). GDNF fördert das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der ENS-Vorläuferzellen (Heuckeroth et al., 1998). Laut einiger Studien ist zum Zeitpunkt der Geburt die Besiedelung des Darms bereits abgeschlossen und Ganglien bzw. der Plexus myentericus und der Plexus submucosus ausgebildet (Young et al., 2001; Young et al., 2003). Wang et al. konnten allerdings 2010 zeigen, dass der Plexus submucosus noch ca. zwei Wochen post partum proliferiert (Wang et al., 2010). Und auch die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Differenzierung des ENS zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht beendet ist, sondern weiterhin stattfindet. Zusätzlich zur postnatalen mRNA-Expression von GDNF und dessen korrespondierenden Rezeptoren konnte sogar ein Anstieg im Stadium P6 im Dünndarm sowie in den Stadien P3 und P6 im Dickdarm gezeigt werden. Es stellt sich die Frage, wie dieser Anstieg zu erklären ist. Laut Wang et al. (2010) proliferiert der Plexus submucosus zu diesem Zeitpunkt noch deutlich (Wang et al., 2010). Die vorliegenden Ergebnisse zeigten daneben, dass die Expressionswerte zum Stadium P21 und Adult hin abfielen und sich auf einem niedrigen Niveau hielten, was darauf schließen lässt, dass die Differenzierungsvorgänge nach Stadium P6 größtenteils abgeschlossen sind. Dies deckt sich auch mit früheren Studien, die ein höheres GDNF mRNA-Expressionslevel während der Entwicklung und ein niedrigeres im adulten Stadium aufzeigen konnten

(Golden et al., 1999). Die Ergebnisse aus der vorliegenden Entwicklungsstudie am Rattendarm unterstützen diese Schlussfolgerung. Es zeigte sich eine stetige Weiterdifferenzierung der glatten Muskulatur im Rattendarm. Erst im Stadium P21 waren histologisch alle Einzelstrukturen des Rattendarms, wie die Lamina muscularis mucosae, eine ausgeprägte und deutlich unterscheidbare Ring- und Längsmuskulatur, als auch ein deutlicher Plexus myentericus und submucosus erkennbar. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich gerade in diesem Entwicklungsabschnitt ein Zusammenspiel zwischen ENS und glatter Muskulatur entwickelt. Eine Vermittlerrolle zwischen ENS und enterischer Muskulatur nehmen die interstitiellen Cajal Zellen (ICC) ein (Hirst und Ward, 2003). Ebenso wie die enterischen Nervenzellen besiedeln auch die ICCs den Gastrointestinaltrakt in rostrokaudaler Richtung, allerdings mit dem Unterschied, dass deren Besiedelung der Entwicklung des Darmtraktes hinterher hinkt (Wu et al., 2000). Dies könnte eine Erklärung für die zeitliche Verzögerung der Differenzierung des ENS am Darm sein. Im Dünndarm zeigten sich annähernd zweifach höhere GDNF mRNA-Expressionswerte als im Dickdarm. Ebenso zeigten die GFR α 1-Expressionswerte zweifach höhere Werte im Dünndarm. Die RET-Expressionswerte waren annähernd gleich. Dies spricht für stärkere Differenzierungsvorgänge im Dünndarm bis hin zum Stadium P6. Danach hielten sich die Expressionswerte von Dün- und Dickdarm auf gleichem Niveau. Auffällig ist zudem das geringere GFR α 1 mRNA-Expressionslevel im Dickdarm. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer GDNF Substitution einen 57 %igen Anstieg der myenterischen Neurone im Dünndarm aber keinen Anstieg im Dickdarm aufwiesen (Wang et al., 2010). Es stellt sich die Frage, ob dies auf die geringeren GFR α 1 mRNA-Expressionswerte im Dickdarm zurückführbar ist. Es lagen gleiche RET mRNA-Expressionswerte im Dün- bzw. Dickdarm vor, da aber die GFR α 1-Expression im Dickdarm geringer ausfiel, spricht das für eine reduzierte Ansprechbarkeit auf GDNF im Dickdarm. Warum weniger GDNF im Kolon exprimiert wurde, ist fraglich. Die Ergebnisse der Ontogenesestudie zeigten histologisch keine auffallenden Unterschiede in der Ausprägung der glatten Muskulatur.

5.4 Lokalisation von Caldesmon in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen

Aufbauend auf den Ergebnissen der mRNA-Expressionsstudie des GDNF Systems wurden aus den Entwicklungsstadien P2/P3, ausgehend von einer hohen mRNA-Expression von GDNF, Muskelzellen aus dem Dünndarm kultiviert (ISMC). Ergebnis dieser Versuchsreihe war, dass die Muskelzellen auch in Kultur weitgehend ihren Phänotyp beibehielten und auch die Expression von Komponenten des kontraktile Apparates, in Form von Myofilamenten, nachweisbar war. Diese Ergebnisse sind etwas überraschend, wird doch allgemein eine Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen in vitro beschrieben. Mit zunehmender Proliferationsaktivität kommt es zu einer phänotypischen Modulation, die in Änderungen der morphologischen, immunzytologischen und kontraktile Eigenschaften mündet (Chamley-Campbell et al., 1979). Mit zunehmender Kultivierungsdauer ist eine Änderung des kontraktile Phänotyps hin zu einem synthetischen beschrieben, was mit dem Fehlen der myofilamentären Strukturen einhergeht (Campbell et al., 1987; Shi und Sarna, 2013). Die Mehrzahl der vorhandenen Studien bezieht sich allerdings auf kultivierte vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) adulter Ratten (Owens et al., 1986), adulter humaner Aortenmedia (Thyberg et al., 1985), adulter porciner Koronararterien (Christen et al., 1999) und adulter Kaninchenaorten (Campbell et al., 1989). Die Tatsache, dass meist adulte Entwicklungsstadien verwendet wurden, legt nahe, dass adulte Zellen in Kultur schneller ihren Phänotyp verlieren.

Neben der morphologischen Veränderung wird auch ein Abfall der mRNA-Expression von kontraktile Muskelmarkern wie α -SMA und Desmin aus ISMCs (Nair et al., 2011) sowie α -SMA (Christen et al., 1999) und Caldesmon aus VSMCs (Glukhova et al., 1988) beschrieben. Batista Lobo et al. brachten 2007 den Nachweis einer α -SMA-Expression in kultivierten ISMC vom Rattendarm (P1-4), jedoch merkte die Arbeitsgruppe die „Kontamination“ mit enterischen Neuronen an (Batista Lobo et al., 2007). Ähnliche Probleme mit einem „Overgrowth“ hatten Xu et al. 2009 mit VSMC von 2 Monate alten Ratten (Xu et al., 2009). In dieser Studie waren endotheliale Zellen ein Problem bei der Kultivierung. Neben dem Erhalt des kontraktile Phänotyps konnte in der vorliegenden Studie, im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen, auch eine nahezu „Reinkultur“ an glatten enterischen Muskelzellen erzeugt werden. Diese Kultivierungsmethode enterischer Muskelzellen (3.2.1.2.)

zeigt sich somit den bisherigen Methoden überlegen. Dies stellt einen wichtigen Punkt der vorliegenden Arbeit dar, denn zum einen existieren kaum Beschreibungen zu enterischen Muskelzellkulturen, zum anderen zeigen die beschriebenen Methoden Probleme bei der Kultivierung auf. Somit stellt die vorliegende Kultivierungsmethode eine gute Möglichkeit dar, weitere Untersuchungen an glatten enterischen Muskelzellen mit erhaltener kontraktile Funktion durchzuführen.

5.5 mRNA-Expression des GDNF Systems in kultivierten glatten Muskelzellen und Charakterisierung enterischer Neurone in Kokulturen

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen der vorliegenden Studie stellt sich nun die Frage, ob das „Neurotropher-Faktor-Konzept“ (Korsching, 1993) auch auf den Gastrointestinaltrakt übertragbar ist. Dieses Konzept wurde für das zentrale Nervensystem aufgestellt und beschreibt, dass innerviertes Gewebe ein spezifisches Signal (neurotrophe Faktoren) produziert, welches sich direkt an die innervierenden Neurone richtet. Diese Neurone exprimieren den korrespondierenden Rezeptor für die neurotrophen Faktoren, die nach Bindung eine Begrenzung des Zelltodes bewirken (Oppenheim, 1991; Korsching, 1993). Überträgt man dieses Konzept auf die enterische Muskulatur, würde das bedeuten, dass glatte enterische Muskelzellen GDNF (neurotropher Faktor) produzieren, dieses direkt auf enterisches Nervengewebe mit den korrespondierenden Rezeptoren (GFR α 1 und RET) einwirkt und dessen Überleben fördert (Abb. 14) (Böttner et al., 2013).

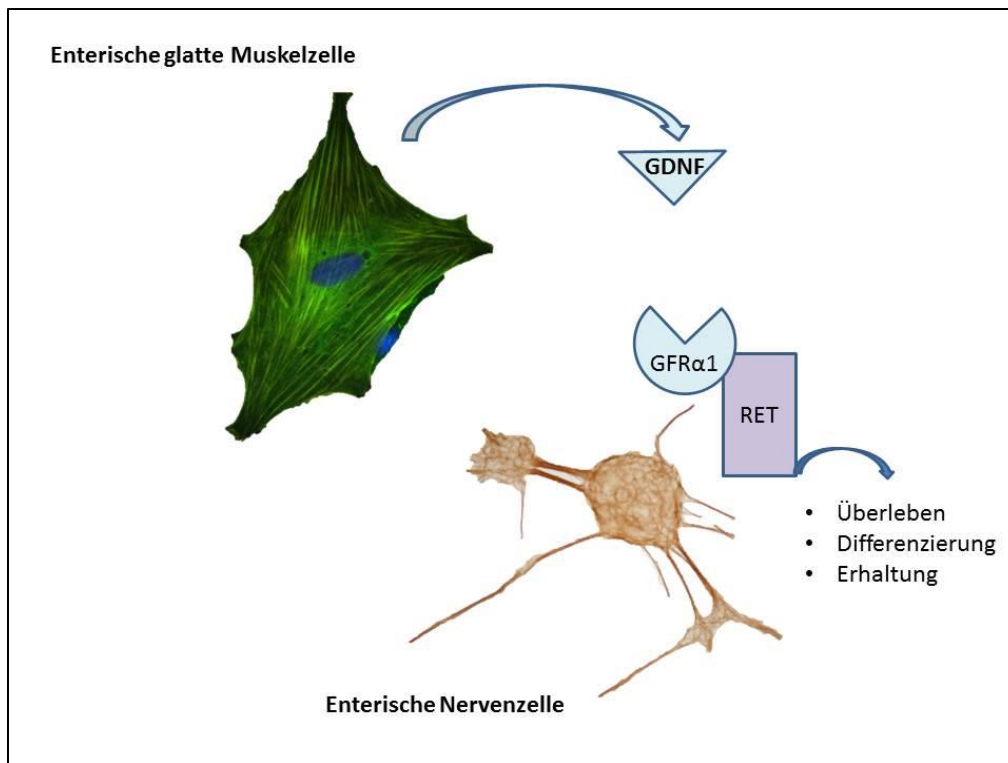


Abb. 14: Modell „Neurotropher-Faktor-Konzept“ im Intestinaltrakt.

Glatte enterische Muskelzellen produzieren den neurotrophen Faktor GDNF, welcher direkt über die korrespondierenden Rezeptoren GFRα1 und RET auf enterisches Nervengewebe einwirkt und dessen Überleben fördert.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionstudie des GDNF-Systems in kultivierten glatten enterischen Muskelzellen zeigten, dass sowohl bei 7-tägiger als auch bei 14-tägiger Kultivierungsdauer eine mRNA-Expression nachweisbar war. Diese Ergebnisse waren unabhängig vom gewählten Medium (Neurobasalmedium + B27 vs. Standardvollmedium). Zwar bestand eine höhere Expression im Vollmedium, jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant. Dies zeigt, dass die glatten Muskelzellen auch im Neurobasalmedium GDNF produzieren. Somit stellte sich dieses Medium als geeignet dar, um Ko-Kulturen mit kultivierten enterischen Nervenzellen anzulegen. Neben der mRNA-Expression von GDNF wurden auch seine korrespondierenden Rezeptoren GFRα1 und RET exprimiert, wobei RET eine signifikante Expressionssteigerung im Standardvollmedium zeigte. GFR α1 wurde als Nachweis enterischer Ganglien beschrieben (Golden et al., 1999), RET wurde hingegen in ENS-Vorläuferzellen entdeckt (Pachnis et al., 1993; Attie-Bitach et al., 1998). Während der embryonalen Entwicklung führen die beiden Rezeptoren zusammen mit GDNF zur Einwanderung von NCC in den Gastrointestinaltrakt und

sichern das Überleben sowie die Differenzierung der NCCs (Young et al., 2001). Es stellt sich somit die Frage, warum auch in den glatten Muskelzellkulturen eine Expression von GFR α 1 und RET nachgewiesen werden konnte. Neuere Studien zeigten, dass GFR α 1 und RET zwar hauptsächlich in myenterischen Ganglien exprimiert werden, jedoch auch in der Ring- und Längsmuskulatur des Darms nachweisbar sind (Barrenschee et al., 2013). Auch Muskelzellen scheinen in der Lage zu sein, geringe Mengen an mRNA der Rezeptoren GFR α 1 und RET zu exprimieren. Dies konnte an quergestreiften Muskelzellen bereits nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1999). Die Bedeutung des neurotrophen Faktors GDNF wird anhand einer Studie von Wang et al. aus dem Jahr 2010 deutlich. Hierbei führte ein Anstieg der GDNF Konzentration zu einem Anstieg der Anzahl an enterischen Neuronen (Wang et al., 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer Ablation einer der Komponenten des GDNF-Systems eine intestinale Aganglionose aufweisen (Durbec et al., 1996; Moore et al., 1996; Cacalano et al., 1998).

An Nervenzellkulturen wurde der direkte Einfluss von GDNF untersucht. Es zeigte sich bei steigender GDNF-Zugabe auch eine Erhöhung der Expression der korrespondierenden Rezeptoren. Zudem konnte ein Anstieg der neuronalen Netzbildung aufgezeigt werden (Böttner et al., 2013). Der Einfluss des GDNFs auf Nervenzellen ist hinreichend beschrieben. Es stellt sich somit die Frage, wo wird GDNF gebildet? Rodrigues et al. konnten erstmals intestinale glatte Muskelzellen (ISMC) als primären Produzenten von GDNF aufzeigen (Rodrigues et al., 2011). Eine weitere aktuelle Studie beschrieb ebenfalls als Hauptquelle für GDNF die Ring- und Längsmuskulatur des humanen Dickdarms (Barrenschee et al., 2013). Die vorliegende Arbeit konnte erstmalig zeigen, dass eine reine Muskelzellkultur in der Lage ist, GDNF zu exprimieren. Um auch den Effekt dieser GDNF Expression zu untersuchen, wurden Ko-Kulturstudien entwickelt. Dabei wurden auf einem Feeder-Layer von Muskelzellen eine definierte Anzahl an enterischen Nervenzellen ausgesät und diese über eine Woche mit Neurobasalmedium + B27 kultiviert. Die Ergebnisse zeigten ein deutliches Nervenzellwachstum und Netzbildung unter dem Einfluss der Muskelzellen. Ähnliche Ergebnisse ließen sich mit der Zugabe von GDNF auf Nervenzellkulturen bewirken. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass die Muskelzellen die Quelle des GDNF darstellen. GDNF ist ein bedeutender neurotropher Faktor, jedoch existieren noch weitere Faktoren, die eine Rolle bei den

neuronalen Differenzierungsvorgängen haben könnten. GDNF gehört zur Gruppe der glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands (GFLs), ebenso wie Neurturin (NRTN), Persephin (PSPN) und Artemin (ARTN). Diese stellen wiederum eine Subfamilie der TGF- β Superfamilie dar (Gianino et al., 2003). Neurturin bindet am korrespondierenden Rezeptor GFR α 2 und der Knock-out von NRTN führt bei Mäusen zu einer Reduktion des myenterischen Plexus und zu einer reduzierten Motilität (Heuckeroth et al., 1999). Eine mRNA-Expression von NRTN konnte in der Ring- und Längsmuskulatur im humanen Kolon nachgewiesen werden (Barrenschee et al., 2013). Im Gegensatz zu NRTN und GDNF besitzen Artemin und Persephin nur unterstützende neurotrophe Wirkung (Golden et al., 1999). Eine weitere Subfamilie stellt die der bone morphogenetic proteins (BMPs) dar. Mittlerweile sind 15 Subtypen beschrieben (Even et al., 2012). Für eine Reihe von Subtypen konnte bereits ein positiver neurotropher Effekt dargestellt werden (Jordan et al., 1997). So haben die Subtypen BMP 2 und 4 Einfluss auf die Anzahl der enterischen Nervenzellen (Chalazonitis et al., 2004).

Ob diese weiteren neurotrophen Faktoren die neuronalen Differenzierungsvorgänge im Darm in gleichem Maße wie GDNF und dessen korrespondierende Rezeptoren GFR α 1 und RET beeinflussen, konnte allerdings bisher noch nicht gezeigt werden. Hier müssen weitere Arbeiten die Zusammenhänge näher darstellen.

5.6 Bedeutung der Ergebnisse bezüglich der Pathogenese der Divertikelkrankheit

Die Pathogenese der Divertikelkrankheit ist nach wie vor nicht vollständig geklärt, wobei mittlerweile ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen angenommen wird (Wedel und Böttner, 2014). Zu den klassischen Risikofaktoren zählen neben zunehmendem Alter (Jun und Stollman, 2002; Martel und Raskin, 2008) und genetischen Prädispositionen (Lee, 1986) auch ballaststoffarme Ernährung (Painter und Burkitt, 1975) sowie ein erhöhtes Körpergewicht (Rosemar et al., 2007). Auch Veränderungen des Bindegewebes wie z.B. eine erhöhte Quervernetzung der Kollagenfibrillen (Wess et al., 1995) oder eine vermehrte Elastineinlagerung (Stumpf et al., 2001) konnte bei Patienten mit Divertikelkrankheit gezeigt werden.

Neben diesem klassischen entstand in den letzten Jahren ein neues pathogenetisches Konzept, welches der Divertikelkrankheit eine neuromuskuläre Ursache zugrunde legt. Diese geht einher mit einer oligoneuronalen Hypoganglionose und einer Reduktion der intramuskulären Nervenfasern (Wedel et al., 2010). Daneben konnten auch eine Neurotransmitterimbalance (Milner et al., 1990; Bassotti et al., 2001; Golder et al., 2003; Golder et al., 2007; Deduchovas et al., 2008; Simpson et al., 2009; Knowles et al., 2010; Böttner et al., 2012; Humes et al., 2012) sowie eine enterische Myopathie gezeigt werden. Die Myopathie ist gekennzeichnet durch strukturelle Veränderungen wie z.B. eine Muskelverdickung (Morson, 1963; Whiteway und Morson, 1985) sowie durch funktionelle Veränderungen wie eine Reduktion von glattmuskulären Elementen (Hellwig et al., 2013). Des Weiteren konnte bei Divertikelpatienten eine Reduktion der Expression von GDNF (Böttner et al., 2013) demonstriert werden. Da GDNF als neurotropher Faktor eine essentielle Rolle bei der Differenzierung und Erhaltung der enterischen Neurone zukommt, unterstützt dies die Rolle einer Neuromyopathie bei der Entstehung der Divertikelkrankheit.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die glatte Muskulatur die Quelle des GDNFs darstellt und daher in der Lage ist, die Proliferation von Nervenzellen direkt zu beeinflussen. Somit unterstreicht diese die enorme Bedeutung von GDNF auf die Ausbildung eines intakten enterischen Nervensystems und ermöglicht die Konstruktion folgender Hypothese zur Entstehung der Divertikelkrankheit: Zunächst entwickelt sich eine enterische Myopathie, in deren Auswirkung sich eine Reduktion der Expression von GDNF durch die glatten Muskelzellen ergibt. Im Sinne des „Neurotropher-Faktor-Konzeptes“ könnte es im weiteren Verlauf dadurch zum Verlust an enterischen Nervenzellen und somit zur Entstehung einer enterischen Neuropathie kommen.

Möglich wäre allerdings auch ein zunächst auftretendes entzündliches Geschehen, welches sekundär zur Bildung einer Neuromyopathie führt und somit die Entstehung der Divertikuloose begünstigt.

5.7 Aussicht

Mit Verweis auf die hohe Inzidenz an Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltraktes des Menschen und dem wenig erforschten Gebiet der gastrointestinalen Motilitätsstörungen in der Veterinärmedizin ist es nötig, weitere in vivo- und in vitro-Studien durchzuführen. Diese Arbeit liefert ein geeignetes Zellkulturmodell, um zum einen die Pathogenese von Motilitätsstörungen und zum anderen die spezielle Wechselwirkung zwischen enterischer Muskelzelle und enterischer Nervenzelle besser zu verstehen. Die Erkenntnisse können schlussendlich helfen, Wege zu finden, gastrointestinale Erkrankungen vorzubeugen bzw. zu therapieren.

6 Zusammenfassung

Hintergrund dieser Arbeit

Die Vermittlung der gastrointestinalen Motilität erfolgt vorrangig durch das Zusammenspiel des enterischen Nervensystems und der intestinalen Muskulatur. Entsprechend können gastrointestinale neuromuskuläre Pathologien zu teilweise schweren Störungen der gastrointestinalen Motilität führen, die u.a. auch bei der Divertikelkrankheit beschrieben wurden. Der neurotrophe Faktor glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) ist wesentlich beteiligt an der Entwicklung, Differenzierung und funktionellen Intaktheit des enterischen Nervensystems. Im Sinne des "Neurotropher-Faktor-Konzeptes" wird postuliert, dass GDNF vom Zielgewebe (enterische Muskulatur) produziert wird, um das Ausgangsgewebe (enterisches Nervensystem) für seine Aufgaben zu stimulieren (Innervation der enterischen Muskulatur).

Fragestellung

Vor diesem Hintergrund sollte im Tiermodell der Ratte zunächst die postnatale Entwicklung und Differenzierung der enterischen Muskulatur beschrieben sowie die ontogenetische Expression des GDNF-Systems (GDNF, GDNF-Rezeptoren) untersucht werden. In einem weiteren Ansatz sollte ein Zellkulturmodell enterischer Muskelzellen etabliert werden, um zu prüfen, ob es unter diesen in-vitro Bedingungen ebenfalls zur Expression des GDNF-Systems kommt. In einem abschließenden Schritt sollte untersucht werden, ob die GDNF-produzierenden kultivierten enterischen Muskelzellen vergleichbare neurotrophe Effekte auf das enterische Nervensystem aufweisen wie die alleinige Supplementierung von GDNF. Aus den Befunden sollten Rückschlüsse auf die bei der Divertikelkrankheit vorliegenden intestinalen Innervationsstörungen gezogen werden.

Material und Methoden

Zur Untersuchung der postnatalen Differenzierung der enterischen Muskulatur wurden der Dün- und Dickdarm von Ratten unterschiedlicher Altersstufen (P2, P21, Adult) mit konventionellen histologischen (HE, Azan) und immunhistochemischen (Caldesmon) Färbemethoden behandelt. Mittels quantitativer realtime PCR wurde die Genexpression des GDNF-Systems (GDNF, GDNF-Liganden) untersucht. Zur

Etablierung einer enterischen Muskelzellkultur wurden Muskelzellen vom Rattendarm des Stadiums P2/3 isoliert und kultiviert. Der glattmuskuläre Phänotyp wurde immunhistochemisch (Caldesomon, α -SMA) konfirmiert. Nach ein- und zweiwöchiger Kulturdauer wurde die Genexpression des GDNF-Systems (GDNF, GDNF-Liganden) mittels quantitativer realtime PCR untersucht. Da sich die enterischen Muskelzellen auch mit Neurobasalmedium kultivieren ließen, wurde ein Ko-Kulturmodell von enterischen Muskel- und Nervenzellen angelegt und die Proliferation der Nervenzellen im Vergleich zur alleinigen GDNF-Supplementierung untersucht.

Ergebnisse

Bezüglich der Ontogenese der enterischen Muskulatur im Dün- und Dickdarm der Ratte konnte gezeigt werden, dass zu allen Zeitpunkten das GDNF-System exprimiert wurde. Die höchsten Expressionen von GDNF und seiner Rezeptoren wurden in frühen postnatalen Stadien beobachtet. Enterische Muskelzellen ließen sich erfolgreich kultivieren und behielten ihren kontraktile Phänotyp. Zudem konnte die Expression von GDNF und seiner Rezeptoren nach ein- und zweiwöchiger Kulturdauer sowohl im Vollmedium als auch im Neurobasalmedium nachgewiesen werden. Nach Ko-Kultur von enterischen Muskelzellen und Nervenzellen wurde eine vergleichbare Proliferation und Differenzierung der neuronalen Netzwerke beobachtet wie unter alleiniger Exposition der kultivierten Nervenzellen mit GDNF.

Schlussfolgerung

Die erhobenen Befunde lassen den Rückschluss zu, dass die enterische Muskulatur, insbesondere während früher postnataler Entwicklungsstadien, das GDNF-System exprimiert und in der Lage ist, die Entwicklung und Differenzierung des enterischen Nervensystems zu fördern. Damit konnte zum einen das "Neurotropher-Faktor-Konzept" auf Ebene des Gastrointestinaltraktes belegt und zum anderen die funktionelle Bedeutung der enterischen Muskulatur für eine regelrechte Ausdifferenzierung des enterischen Nervensystems aufgezeigt werden. Hinsichtlich der Pathogenese der Divertikelkrankheit wäre es entsprechend vorstellbar, dass der hier beobachtete Nervenzellverlust (enterische Neuropathie) durch ein Defizit von durch die enterische Muskulatur produzierten neurotrophen Faktoren (enterische Myopathie) bedingt ist. Darüber hinaus bietet das in dieser Arbeit etablierte Kulturmodell enterischer Muskelzellen die Möglichkeit, das Spektrum

gastrointestinaler Motilitätsstörungen unter standardisierten in-vitro Bedingungen weiter zu untersuchen und insbesondere die funktionelle Beziehung zwischen enterischer Muskulatur und Nervensystem näher aufzuklären.

7 Summary

Background

Mediation of gastrointestinal motility is primarily generated by the interaction of the enteric nervous system and the enteric musculature. Therefore gastrointestinal neuromuscular pathologies could cause severe gastrointestinal motility disorders as they have been described in patients with diverticular disease. Glial cell line-derived neurotrophic factor GDNF is significantly involved in the development, differentiation and functional integrity of the enteric nervous system. The "neurotrophic factor concept" postulates that GDNF is produced by the target tissue (enteric muscles) in order to stimulate the tissue of origin (enteric nervous system) for its function (innervation of the enteric muscles).

Aim of the study

Against this background the postnatal development and differentiation of the rat enteric muscles as well as the ontogenetic expression of the GDNF system (GDNF, GDNF receptors) should be analyzed in an animal model. In another approach, a cell culture model of enteric muscle cells should be established in order to investigate whether an expression of the GDNF system could be observed under in-vitro conditions. Finally the neurotrophic effects of the GDNF-producing cultured enteric muscle cells on the enteric nervous system should be studied and compared to those of an exclusive supplementation of GDNF. The results should be used to explain the dysfunction of the enteric innervation in motility disorders like the diverticular disease.

Material and methods

In order to examine the postnatal differentiation of the enteric musculature small and large intestine of rats of different ages (P2, P21, adult) were prepared with conventional histological (HE, Azan) and immunohistochemical (caldesmon) staining. Gene expression of GDNF system (GDNF, GDNF ligands) was investigated by using quantitative real time PCR. To establish an enteric muscle cell culture model enteric muscle cells were isolated and cultured from intestines of rats of stage P2/3. The smooth muscle phenotype was confirmed immunohistochemically (Caldesomon, α -SMA). After one and two weeks of culturing, gene expression of the GDNF system (GDNF, GDNF ligands) was examined by quantitative real time PCR. As the enteric

muscle cells could be cultivated with neurobasal medium, a co-culture model of enteric muscle and nerve cells has been carried out in order to study the proliferation of nerve cells in comparison to an exclusive GDNF supplementation.

Results

Concerning the ontogenesis of the enteric muscles in the small and large intestine of rats, it has been shown that the GDNF system has been expressed at all time points regarded. The highest expression of GDNF and its receptors has been observed in early postnatal stages. Enteric smooth muscle cells could be cultivated successfully and retained their contractile phenotype. Additionally, expression of GDNF and its receptors could be detected at one and two weeks of culture period in complete as well as in neurobasal medium. After co-culturing of enteric muscle cells and nerve cells, a similar proliferation and differentiation of neural networks was observed as well as under exclusive exposure of cultured neurons with GDNF.

Conclusion

These findings lead to the conclusion that enteric muscles express the GDNF system especially during early postnatal developmental stages and therefore are able to support the development and differentiation of the enteric nervous system. Thereby firstly the "neurotrophic factor concept" could be proved at the level of the gastrointestinal tract and, secondly, the functional importance of the enteric muscles for a proper differentiation of the enteric nervous system could be demonstrated. Accordingly, in regard to the pathogenesis of diverticular disease, it would be conceivable that the observed neuronal loss (enteric neuropathy) is caused by a deficit of neurotrophic factors produced by the enteric muscles (enteric myopathy). In addition, the established culture model of enteric muscle cells provides the opportunity to investigate other gastrointestinal motility disorders under standardized in-vitro conditions and to elucidate particularly the functional relationship between enteric muscles and nervous system in more detail.

8 Literaturverzeichnis

- Ahlman, H. and Nilsson (2001). "The gut as the largest endocrine organ in the body." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 12 Suppl 2: S63-68.
- Airaksinen, M. S. and Saarma, M. (2002). "The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value." *Nature reviews. Neuroscience* 3(5): 383-394.
- Airaksinen, M. S., Titievsky, A. and Saarma, M. (1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" *Molecular and cellular neurosciences* 13(5): 313-325.
- Attie-Bitach, T., Abitbol, M., Gerard, M., Delezoide, A. L., Auge, J., Pelet, A., Amiel, J., Pachnis, V., Munnich, A., Lyonnet, S. and Vekemans, M. (1998). "Expression of the RET proto-oncogene in human embryos." *American journal of medical genetics* 80(5): 481-486.
- Auerbach (1862). "Über einen Plexus myentericus, einen bisher unbekannten ganglionervösen Apparat im Darmkanal der Wirbeltiere." *Breslau, E. Morgenstern*.
- Barrenschée, M., Böttner, M., Hellwig, I., Harde, J., Egberts, J. H., Becker, T. and Wedel, T. (2013). "Site-specific gene expression and localization of growth factor ligand receptors RET, GFRalpha1 and GFRalpha2 in human adult colon." *Cell and tissue research* 354(2): 371-380.
- Bassotti, G., Battaglia, E., Spinozzi, F., Pelli, M. A. and Tonini, M. (2001). "Twenty-four hour recordings of colonic motility in patients with diverticular disease: evidence for abnormal motility and propulsive activity." *Diseases of the colon and rectum* 44(12): 1814-1820.
- Batista Lobo, S., Denyer, M., Britland, S. and Javid, F. A. (2007). "Development of an intestinal cell culture model to obtain smooth muscle cells and myenteric neurones." *Journal of anatomy* 211(6): 819-829.
- Bertoy, R. W. (2002). "Megacolon in the cat." *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 32(4): 901-915.
- Böttner, M., Barrenschée, M., Hellwig, I., Harde, J., Egberts, J. H., Becker, T., Zorenkov, D., Schafer, K. H. and Wedel, T. (2013). "The GDNF System Is Altered in Diverticular Disease - Implications for Pathogenesis." *PloS one* 8(6): e66290.
- Böttner, M., Barrenschée, M., Hellwig, I., Harde, J., Egberts, J. H., Becker, T., Zorenkov, D. and Wedel, T. (2012). "The enteric serotonergic system is altered in patients with diverticular disease." *Gut*.
- Böttner, M. and Wedel, T. (2012). "Abnormalities of neuromuscular anatomy in diverticular disease." *Digestive diseases* 30(1): 19-23.

- Bretscher, A. and Lynch, W. (1985). "Identification and localization of immunoreactive forms of caldesmon in smooth and nonmuscle cells: a comparison with the distributions of tropomyosin and alpha-actinin." *The Journal of cell biology* 100(5): 1656-1663.
- Burns, A. J., Lomax, A. E., Torihashi, S., Sanders, K. M. and Ward, S. M. (1996). "Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(21): 12008-12013.
- Cacalano, G., Farinas, I., Wang, L. C., Hagler, K., Forgie, A., Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, A. M., Reichardt, L. F., Hynes, M., Davies, A. and Rosenthal, A. (1998). "GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney." *Neuron* 21(1): 53-62.
- Cajal (1893). "Sur les ganglios nerveux de l'intestine." *C R Soc Biol V (Paris)*: 217-223.
- Campbell, J. H., Campbell, G. R., Kocher, O. and Gabbiani, G. (1987). "Cell biology of smooth muscle in culture: implications for atherogenesis." *International angiology : a journal of the International Union of Angiology* 6(1): 73-79.
- Campbell, J. H., Kocher, O., Skalli, O., Gabbiani, G. and Campbell, G. R. (1989). "Cytodifferentiation and expression of alpha-smooth muscle actin mRNA and protein during primary culture of aortic smooth muscle cells. Correlation with cell density and proliferative state." *Arteriosclerosis* 9(5): 633-643.
- Chalazonitis, A., D'Autreaux, F., Guha, U., Pham, T. D., Faure, C., Chen, J. J., Roman, D., Kan, L., Rothman, T. P., Kessler, J. A. and Gershon, M. D. (2004). "Bone morphogenetic protein-2 and -4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC-expressing neurotrophin-3-dependent subset." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(17): 4266-4282.
- Chalovich, J. M., Chen, Y. D., Dudek, R. and Luo, H. (1995). "Kinetics of binding of caldesmon to actin." *The Journal of biological chemistry* 270(17): 9911-9916.
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R. and Ross, R. (1979). "The smooth muscle cell in culture." *Physiological reviews* 59(1): 1-61.
- Christen, T., Bochaton-Piallat, M. L., Neuville, P., Rensen, S., Redard, M., van Eys, G. and Gabbiani, G. (1999). "Cultured porcine coronary artery smooth muscle cells. A new model with advanced differentiation." *Circulation research* 85(1): 99-107.
- Deduchovas, O., Saladzinskas, Z., Tamelis, A., Pavalkis, D., Pauziene, N. and Pauza, D. H. (2008). "Morphologic pattern of myenteric neural plexus in colonic diverticular disease. A whole-mount study employing histochemical staining for acetylcholinesterase." *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 190(6): 525-530.

- Dingus, J., Hwo, S. and Bryan, J. (1986). "Identification by monoclonal antibodies and characterization of human platelet caldesmon." *The Journal of cell biology* 102(5): 1748-1757.
- Draeger, A., Amos, W. B., Ikebe, M. and Small, J. V. (1990). "The cytoskeletal and contractile apparatus of smooth muscle: contraction bands and segmentation of the contractile elements." *The Journal of cell biology* 111(6 Pt 1): 2463-2473.
- Durbec, P. L., Larsson-Blomberg, L. B., Schuchardt, A., Costantini, F. and Pachnis, V. (1996). "Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts." *Development* 122(1): 349-358.
- Even, J., Eskander, M. and Kang, J. (2012). "Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses." *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 20(9): 547-552.
- Furness, J. B. (2000). "Types of neurons in the enteric nervous system." *Journal of the autonomic nervous system* 81(1-3): 87-96.
- Furness, J. B. (2012). "The enteric nervous system and neurogastroenterology." *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 9(5): 286-294.
- Gattuso, J. M. and Kamm, M. A. (1993). "Review article: the management of constipation in adults." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 7(5): 487-500.
- Gershon, M. D. (1997). "Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system." *Current opinion in neurobiology* 7(1): 101-109.
- Gianino, S., Grider, J. R., Cresswell, J., Enomoto, H. and Heuckeroth, R. O. (2003). "GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation." *Development* 130(10): 2187-2198.
- Glukhova, M. A., Kabakov, A. E., Frid, M. G., Ornatsky, O. I., Belkin, A. M., Mukhin, D. N., Orekhov, A. N., Koteliansky, V. E. and Smirnov, V. N. (1988). "Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(24): 9542-9546.
- Golden, J. P., DeMaro, J. A., Osborne, P. A., Milbrandt, J. and Johnson, E. M., Jr. (1999). "Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse." *Experimental neurology* 158(2): 504-528.
- Golder, M., Burleigh, D. E., Belai, A., Ghali, L., Ashby, D., Lunniss, P. J., Navsaria, H. A. and Williams, N. S. (2003). "Smooth muscle cholinergic denervation hypersensitivity in diverticular disease." *Lancet* 361(9373): 1945-1951.
- Golder, M., Burleigh, D. E., Ghali, L., Feakins, R. M., Lunniss, P. J., Williams, N. S. and Navsaria, H. A. (2007). "Longitudinal muscle shows abnormal relaxation

- responses to nitric oxide and contains altered levels of NOS1 and elastin in uncomplicated diverticular disease " *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 9(3): 218-228.
- Graceffa, P. (1987). "Evidence for interaction between smooth muscle tropomyosin and caldesmon." *FEBS letters* 218(1): 139-142.
- Hellwig, I., Bottner, M., Barrenschée, M., Harde, J., Egberts, J. H., Becker, T. and Wedel, T. (2013). "Alterations of the enteric smooth musculature in diverticular disease." *Journal of gastroenterology*.
- Heuckeroth, R. O., Enomoto, H., Grider, J. R., Golden, J. P., Hanke, J. A., Jackman, A., Molliver, D. C., Bardgett, M. E., Snider, W. D., Johnson, E. M., Jr. and Milbrandt, J. (1999). "Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons." *Neuron* 22(2): 253-263.
- Heuckeroth, R. O., Lampe, P. A., Johnson, E. M. and Milbrandt, J. (1998). "Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro." *Developmental biology* 200(1): 116-129.
- Hirst, G. D. and Ward, S. M. (2003). "Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle." *The Journal of physiology* 550(Pt 2): 337-346.
- Holzer, P., Reichmann, F. and Farzi, A. (2012). "Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis." *Neuropeptides* 46(6): 261-274.
- Huber, M. a. (1995). "Biochemistry of smooth muscle contraction (Barany, M., ed.)." Academic Press, San Diego, CA: 77-90.
- Huber, P. A. (1997). "Caldesmon." *The international journal of biochemistry & cell biology* 29(8-9): 1047-1051.
- Humes, D. J., Simpson, J., Smith, J., Sutton, P., Zaitoun, A., Bush, D., Bennett, A., Scholefield, J. H. and Spiller, R. C. (2012). "Visceral hypersensitivity in symptomatic diverticular disease and the role of neuropeptides and low grade inflammation." *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 24(4): 318-e163.
- Jordan, J., Bottner, M., Schluesener, H. J., Unsicker, K. and Kriegstein, K. (1997). "Bone morphogenetic proteins: neurotrophic roles for midbrain dopaminergic neurons and implications of astroglial cells." *The European journal of neuroscience* 9(8): 1699-1709.
- Jun, S. and Stollman, N. (2002). "Epidemiology of diverticular disease." *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 16(4): 529-542.
- Kedinger, M., Simon-Assmann, P., Bouziges, F., Arnold, C., Alexandre, E. and Haffen, K. (1990). "Smooth muscle actin expression during rat gut development and induction in fetal skin fibroblastic cells associated with

- intestinal embryonic epithelium." *Differentiation; research in biological diversity* 43(2): 87-97.
- Knowles, C. H., De Giorgio, R., Kapur, R. P., Bruder, E., Farrugia, G., Geboes, K., Lindberg, G., Martin, J. E., Meier-Ruge, W. A., Milla, P. J., Smith, V. V., Vandervinden, J. M., Veress, B. and Wedel, T. (2010). "The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group." *Gut* 59(7): 882-887.
- Korsching, S. (1993). "The neurotrophic factor concept: a reexamination." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(7): 2739-2748.
- Lee, Y. S. (1986). "Diverticular disease of the large bowel in Singapore. An autopsy survey." *Diseases of the colon and rectum* 29(5): 330-335.
- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. and Collins, F. (1993). "GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons." *Science* 260(5111): 1130-1132.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). "Taschenlehrbuch Histologie." 4. Auflage: 694.
- Martel, J. and Raskin, J. B. (2008). "History, incidence, and epidemiology of diverticulosis." *Journal of clinical gastroenterology* 42(10): 1125-1127.
- Matsumura, F. and Yamashiro, S. (1993). "Caldesmon." *Current opinion in cell biology* 5(1): 70-76.
- McLone, D. (2001). "Pediatric Neurosurgery." Fourth Edition: 1382.
- Meissner (1857). "Über die Nerven der Darmwand." *Zeitschrift f. rat. Med. N.F.* 8: 364-366.
- Milner, P., Crowe, R., Kamm, M. A., Lennard-Jones, J. E. and Burnstock, G. (1990). "Vasoactive intestinal polypeptide levels in sigmoid colon in idiopathic constipation and diverticular disease." *Gastroenterology* 99(3): 666-675.
- Moore, M. W., Klein, R. D., Farinas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L. F., Ryan, A. M., Carver-Moore, K. and Rosenthal, A. (1996). "Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF." *Nature* 382(6586): 76-79.
- Morson, B. C. (1963). "The Muscle Abnormality in Diverticular Disease of the Colon." *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 56: 798-800.
- Nair, D. G., Han, T. Y., Lourenssen, S. and Blennerhassett, M. G. (2011). "Proliferation modulates intestinal smooth muscle phenotype in vitro and in colitis in vivo." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300(5): G903-913.

- Natarajan, D., Marcos-Gutierrez, C., Pachnis, V. and de Graaff, E. (2002). "Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis." *Development* 129(22): 5151-5160.
- Ngai, P. K. and Walsh, M. P. (1984). "Inhibition of smooth muscle actin-activated myosin Mg²⁺-ATPase activity by caldesmon." *The Journal of biological chemistry* 259(22): 13656-13659.
- Oppenheim, R. W. (1991). "Cell death during development of the nervous system." *Annual review of neuroscience* 14: 453-501.
- Owada, M. K., Hakura, A., Iida, K., Yahara, I., Sobue, K. and Kakiuchi, S. (1984). "Occurrence of caldesmon (a calmodulin-binding protein) in cultured cells: comparison of normal and transformed cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(10): 3133-3137.
- Owens, G. K., Loeb, A., Gordon, D. and Thompson, M. M. (1986). "Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation." *The Journal of cell biology* 102(2): 343-352.
- Pachnis, V., Mankoo, B. and Costantini, F. (1993). "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." *Development* 119(4): 1005-1017.
- Painter, N. S. and Burkitt, D. P. (1975). "Diverticular disease of the colon, a 20th century problem." *Clinics in gastroenterology* 4(1): 3-21.
- Painter, N. S., Truelove, S. C., Ardran, G. M. and Tuckey, M. (1965). "Effect of Morphine, Prostigmine, Pethidine, and Probanthine on the Human Colon in Diverticulosis Studied by Intraluminal Pressure Recording and Cineradiography." *Gut* 6: 57-63.
- Parisi, M. A. (1993). Hirschsprung Disease Overview. GeneReviews. R. A. Pagon, M. P. Adam, T. D. Bird et al. Seattle (WA).
- Parks, T. G. and Connell, A. M. (1969). "Motility studies in diverticular disease of the colon." *Gut* 10(7): 534-542.
- Penkova, N. I., Baltadjiev, G. A., Koeva, Y. A., Atanassova, P. K., Andonov, V. N. and Trichkova, V. A. (2010). "Prenatal and postnatal differentiation of the small intestine in rat." *Folia medica* 52(1): 54-62.
- Pichel, J. G., Shen, L., Sheng, H. Z., Granholm, A. C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Saarma, M., Hoffer, B. J., Sariola, H. and Westphal, H. (1996). "Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF." *Nature* 382(6586): 73-76.
- Qiao, S., Iwashita, T., Ichihara, M., Murakumo, Y., Yamaguchi, A., Isogai, M., Sakata, K. and Takahashi, M. (2009). "Increased expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin in a case of colon adenocarcinoma

- associated with diffuse ganglioneuromatosis." *Clinical neuropathology* 28(2): 105-112.
- Rensen, S. S., Doevendans, P. A. and van Eys, G. J. (2007). "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity." *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 15(3): 100-108.
- Roberts, D. J. (2000). "Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 219(2): 109-120.
- Rodrigues, D. M., Li, A. Y., Nair, D. G. and Blennerhassett, M. G. (2011). "Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system." *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23(2): e44-56.
- Rosemar, A., Ivarsson, M. L., Borjesson, L. and Holmdahl, L. (2007). "Increased concentration of tissue-degrading matrix metalloproteinases and their inhibitor in complicated diverticular disease." *Scandinavian journal of gastroenterology* 42(2): 215-220.
- Rothman, T. P., Tennyson, V. M. and Gershon, M. D. (1986). "Colonization of the bowel by the precursors of enteric glia: studies of normal and congenitally aganglionic mutant mice." *The Journal of comparative neurology* 252(4): 493-506.
- Rumessen, J. J. and Vanderwinden, J. M. (2003). "Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond." *International review of cytology* 229: 115-208.
- Ryer, K. A. and Ryer, J. (1980). "Acquired achalasia: a case report." *Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC* 75(11): 1703-1704.
- Schäfer, K. H. and Mestres, P. (1999). "The GDNF-induced neurite outgrowth and neuronal survival in dissociated myenteric plexus cultures of the rat small intestine decreases postnatally." *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* 125(4): 447-452.
- Schäfer, K. H., Saffrey, M. J., Burnstock, G. and Mestres-Ventura, P. (1997). "A new method for the isolation of myenteric plexus from the newborn rat gastrointestinal tract." *Brain research. Brain research protocols* 1(2): 109-113.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F. and Pachnis, V. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* 367(6461): 380-383.
- Shi, X. Z. and Sarna, S. K. (2013). "Cell culture retains contractile phenotype but epigenetically modulates cell-signaling proteins of excitation-contraction coupling in colon smooth muscle cells." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 304(4): G337-345.

- Silbernagel, S. (2012). "Taschenatlas Physiologie." 8. Auflage: 455.
- Simpson, J., Scholefield, J. H. and Spiller, R. C. (2002). "Pathogenesis of colonic diverticula." *The British journal of surgery* 89(5): 546-554.
- Simpson, J., Sundler, F., Humes, D. J., Jenkins, D., Scholefield, J. H. and Spiller, R. C. (2009). "Post inflammatory damage to the enteric nervous system in diverticular disease and its relationship to symptoms." *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 21(8): 847-e858.
- Sinowatz, F., Seitz, J. and Bergmann, M. (1998). "Embryologie des Menschen." 380.
- Sobue, K., Muramoto, Y., Fujita, M. and Kakiuchi, S. (1981). "Calmodulin-binding protein of erythrocyte cytoskeleton." *Biochemical and biophysical research communications* 100(3): 1063-1070.
- Sobue, K. and Sellers, J. R. (1991). "Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems." *The Journal of biological chemistry* 266(19): 12115-12118.
- Stelzner, F. (1976). "[Abnormality of the muscular structure of the colon: a possible cause of diverticulosis (author's transl)]." *Langenbecks Archiv fur Chirurgie* 342: 411-412.
- Stumpf, M., Cao, W., Klinge, U., Klosterhalfen, B., Kasperk, R. and Schumpelick, V. (2001). "Increased distribution of collagen type III and reduced expression of matrix metalloproteinase 1 in patients with diverticular disease." *International journal of colorectal disease* 16(5): 271-275.
- Surprenant, A. (1994). "Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons." *Annual review of physiology* 56: 117-140.
- Thuneberg, L. (1982). "Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells?" *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 71: 1-130.
- Thyberg, J., Nilsson, J., Palmberg, L. and Sjolund, M. (1985). "Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype." *Cell and tissue research* 239(1): 69-74.
- Uesaka, T., Jain, S., Yonemura, S., Uchiyama, Y., Milbrandt, J. and Enomoto, H. (2007). "Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype." *Development* 134(11): 2171-2181.
- Vollrath, L. (1969). "[On the development of the rat small intestine. Morphologic, histochemical and experimental studies]." *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 41(2): 3-66.
- von Engelhardt, W. (2009). "Physiologie der Haustiere " 3. Auflage: 736.

- Wallace, A. S. and Burns, A. J. (2005). "Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract." *Cell and tissue research* 319(3): 367-382.
- Wang, C. L. (2008). "Caldesmon and the regulation of cytoskeletal functions." *Advances in experimental medicine and biology* 644: 250-272.
- Wang, H., Hughes, I., Planer, W., Parsadanian, A., Grider, J. R., Vohra, B. P., Keller-Peck, C. and Heuckeroth, R. O. (2010). "The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(4): 1523-1538.
- Ward, S. M., Burns, A. J., Torihashi, S. and Sanders, K. M. (1994). "Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine." *The Journal of physiology* 480 (Pt 1): 91-97.
- Wedel, T. and Böttner, M. (2014). "[Anatomy and pathogenesis of diverticular disease]." *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 85(4): 281-288.
- Wedel, T., Busing, V., Heinrichs, G., Nohroudi, K., Bruch, H. P., Roblick, U. J. and Böttner, M. (2010). "Diverticular disease is associated with an enteric neuropathy as revealed by morphometric analysis." *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 22(4): 407-414, e493-404.
- Wedel, T., Roblick, U., Gleiss, J., Schiedeck, T., Bruch, H. P., Kuhnel, W. and Krammer, H. J. (1999). "Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus." *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 181(4): 327-337.
- Wedel, T., Roblick, U. J., Ott, V., Eggers, R., Schiedeck, T. H., Krammer, H. J. and Bruch, H. P. (2002). "Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow-transit constipation." *Diseases of the colon and rectum* 45(1): 54-62.
- Wess, L., Eastwood, M. A., Wess, T. J., Busuttil, A. and Miller, A. (1995). "Cross linking of collagen is increased in colonic diverticulosis." *Gut* 37(1): 91-94.
- Whiteway, J. and Morson, B. C. (1985). "Pathology of the ageing--diverticular disease." *Clinics in gastroenterology* 14(4): 829-846.
- Wittig, B. M. and Zeitz, M. (2003). "The gut as an organ of immunology." *International journal of colorectal disease* 18(3): 181-187.
- Wood, J. D. (1999). "Neurotransmission at the interface of sympathetic and enteric divisions of the autonomic nervous system." *The Chinese journal of physiology* 42(4): 201-210.

- Wu, J. J., Rothman, T. P. and Gershon, M. D. (2000). "Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand." *Journal of neuroscience research* 59(3): 384-401.
- Xu, S., Fu, J., Chen, J., Xiao, P., Lan, T., Le, K., Cheng, F., He, L., Shen, X., Huang, H. and Liu, P. (2009). "Development of an optimized protocol for primary culture of smooth muscle cells from rat thoracic aortas." *Cytotechnology* 61(1-2): 65-72.
- Yamamoto, M., Mitsuma, N., Inukai, A., Ito, Y., Li, M., Mitsuma, T. and Sobue, G. (1999). "Expression of GDNF and GDNFR-alpha mRNAs in muscles of patients with motor neuron diseases." *Neurochemical research* 24(6): 785-790.
- Yntema, C. L. and Hammond, W. S. (1954). "The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo." *The Journal of comparative neurology* 101(2): 515-541.
- Young, H. M., Bergner, A. J. and Muller, T. (2003). "Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine." *The Journal of comparative neurology* 456(1): 1-11.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Ciampoli, D., Southwell, B. R., Brunet, J. F. and Newgreen, D. F. (1998). "A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture." *Developmental biology* 202(1): 67-84.
- Young, H. M., Hearn, C. J., Farlie, P. G., Canty, A. J., Thomas, P. Q. and Newgreen, D. F. (2001). "GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells." *Developmental biology* 229(2): 503-516.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Bergmann für die Betreuung dieser extern angefertigten Doktorarbeit.

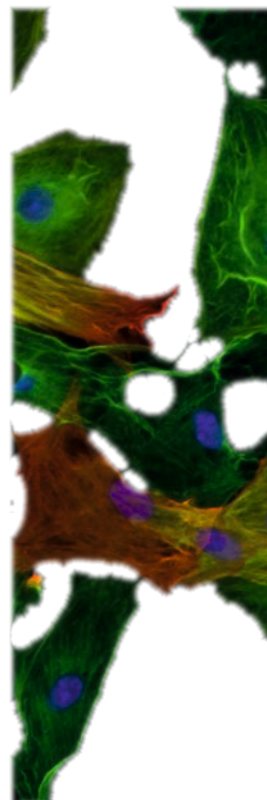
Ich danke Herrn Prof. Dr. Thilo Wedel für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchführen zu können und besonders Frau PD Dr. Martina Böttner für ihre Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich Martina Barrenschee und Jonas Harde für ihre Hilfe bei Fragen aller Art danken.

Für die technische Unterstützung möchte ich mich ganz besonders bei Inka Geurink, Bettina Facompré, Karin Stengel und Miriam Lemmer bedanken.

Besonderer Dank geht an meine Ehefrau Ines Hohmeier, für ihre großartige Unterstützung und Geduld in den letzten Jahren.

Zum Schluss möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe für ihre Kollegialität, Ratschläge und Tipps danken.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6385-6



9 783835 196385 6